

**Gehirnorganisation und immunhistologische Charakterisierung der  
olfaktorischen Gehirnareale in der Landwanze *Pyrrhocoris apterus***

Bachelorarbeit

vorgelegt an der Ernst- Abbe Hochschule Jena

Fachbereich Biotechnologie

Hochschulbetreuerin: Frau Prof. Burse  
Betrieblicher Betreuer: Herr Dr. Rybak  
Institut: Max-Planck-Institut für chemische Ökologie

Bearbeitet von: Victoria Asel

Matrikelnummer: 647120

Betrieblicher Gutachter Dr. Jürgen Rybak  
Abteilung der evolutionären Neuroethologie  
Max-Planck-Institut für chemische Ökologie  
Hans Knöll Straße 8  
07745 Jena

Hochschulgutachterin Prof. Dr. Antje Burse  
Ernst-Abbe-Hochschule Jena  
Fachbereich MT/BT  
Carl-Zeiss-Promenade 2  
07745 Jena

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| II. Abbildungsverzeichnis .....                                 | VI |
| III. Tabellenverzeichnis .....                                  | VI |
| 1. Einleitung.....  | 1  |
| 1.1 Zielstellung .....  | 1  |
| 1.2 Pyrrhocoris apterus .....                                   | 1  |
| 1.3 Aufklärung der Lage des Gehirns .....                       | 2  |
| 1.4 Aufbau des Insektengehirns .....                            | 3  |
| 1.5 Geruchssinn von Insekten.....                               | 5  |
| 1.5.1 Antennen.....   | 5  |
| 1.5.2 Sensillen .....   | 5  |
| 1.5.3 Neuronen .....  | 7  |
| 1.5.4 Olfaktion.....  | 7  |
| 1.6 Neurotransmitter.....                                       | 8  |
| 1.6.1 Neurotransmitter, Neuromodulatoren und Neurohormone ..... | 8  |
| 1.6.2 Neurotransmitter in Insekten .....                        | 8  |
| 1.7 Hypothese .....   | 9  |
| 2. Methoden und Materialien .....                               | 10 |
| 2.1 Materialien.....  | 10 |
| 2.1.1 Chemikalien .....   | 10 |
| 2.1.2 Lösungen .....  | 10 |
| 2.1.3 Primäre Antikörper .....                                  | 10 |
| 2.1.4 Sekundäre Antikörper.....                                 | 11 |
| 2.1.5 Materialien .....   | 11 |
| 2.1.6 Software.....   | 12 |
| 2.2 Methoden .....  | 13 |
| 2.2.1 Computertomographie .....                                 | 13 |
| 2.2.2 Präparation des Gehirns .....                             | 13 |
| 2.2.3 GABA und Synapsin.....                                    | 13 |
| 2.2.4 Serotonin.....  | 14 |
| 2.2.5 R8E6 .....  | 14 |
| 2.2.6 CLSM-Scan.....  | 14 |
| 2.2.7 Rekonstruktion .....                                      | 15 |
| 3. Ergebnisse.....  | 16 |
| 3.1 Lage des Gehirns .....                                      | 16 |
| 3.2 Aufbau des Gehirns.....                                     | 18 |

|  |    |
|--|----|
| 3.3 Färbung des Gehirns mit Synapsin .....                                 | 21 |
| 3.4 Charakterisierung der olfaktorischen Gehirnareale .....                | 23 |
| 3.4.1 Charakterisierung des Antennallobus.....                             | 23 |
| 3.4.1.1 Charakterisierung des Antennallobus durch den Antikörper GABA .... | 23 |
| 3.4.1.2 Färbungen der Antennallobus mittels Serotonins .....               | 24 |
| 3.4.1.3 Glomeruli des Antennallobus .....                                  | 25 |
| 3.4.1.5 Vergleich zu anderen Spezien .....                                 | 26 |
| 3.4.2 Charakterisierung des Pilzkörpers .....                              | 27 |
| 3.4.2.1 Rekonstruktion des Pilzkörpers .....                               | 27 |
| 3.4.2.2 Vergleich des Pilzkörpers mit anderen Spezien.....                 | 29 |
| 4. Diskussion .....  | 30 |
| 4.1 Lage des Gehirns .....   | 30 |
| 4.2 Aufbau des Gehirns.....  | 30 |
| 4.3 Olfaktion in <i>Pyrrhocoris apterus</i> .....                          | 31 |
| 4.4 Ausblick .....   | 33 |
| 5. Zusammenfassung .....   | 34 |
| Danksagung .....   | 35 |
| Quellenangaben .....   | 36 |
| Selbstständigkeitserklärung.....   | 40 |

# I. Abkürzungsverzeichnis

|                   |  |
|-------------------|--|
| AG                | Abdominal Ganglion                                       |
| AL                | Antennallobus  |
| AMMC              | Mechanosensorisches und motorisches Zentrum der Antennen |
| AN                | Antennalnerv   |
| CB                | Zentralkörper  |
| CLSM              | Konfokales Laser-Raster-Mikroskop                        |
| CT                | Computertomographie                                      |
| GABA              | $\gamma$ -Aminobuttersäure                               |
| La                | Lamina   |
| Lo                | Lobula   |
| MB                | Pilzkörper   |
| Me                | Medulla  |
| NGS               | Ziegenserum  |
| OL                | Optische Loben   |
| OSG               | Supraösophagealganglion/Oberschlundganglion              |
| OSN               | olfaktorische sensorische Neuronen                       |
| <i>P. apterus</i> | <i>Pyrrhocoris apterus</i>                               |
| PB                | Protocerebrum  |
| PBS               | Phosphatgepufferte Salzlösung                            |
| PBSTx             | Phosphatgepufferte Salzlösung mit Triton X-100           |
| PFA               | Paraformaldehyd  |
| PN                | Projektionsneuron  |
| PTG               | Prothorakalganglion Ganglion                             |
| RT                | Raumtemperatur   |
| SEM               | Rasterelektronenmikroskop                                |
| TG                | Thorakalganglion   |
| USG               | Unterschlundganglion                                     |
| ZNS               | zentrales Nervensystem                                   |

## II. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Abbildung des Versuchstieres *P. apterus*
- Abbildung 2: Aufbau des Gehirns der Heuschrecke *Locusta migratoria*
- Abbildung 3: Darstellung der Sensillen auf der Antenne der Landwanze *P. apterus*
- Abbildung 4: CT- Darstellung des Kopfes von *P. apterus* und Rekonstruktion der Lage des Gehirns
- Abbildung 5: 3D Darstellung des Gehirns von *P. apterus* in der Amira Funktion Volren
- Abbildung 6: Darstellung und Rekonstruktion der verschiedenen Neuropile des Gehirns von *P. apterus*
- Abbildung 7: immunhistologische Färbung der Neuropile durch die Antikörper Synapsin und GABA im Gehirn von *P. apterus*
- Abbildung 8: Darstellung der immunhistologischen Färbungen mit GABA im AL von *P. apterus*
- Abbildung 9: Darstellung des Gehirns immunhistologisch gefärbt mit Serotonin mit besonderem Merkmal auf dem AL
- Abbildung 10: Darstellung und Rekonstruktion der Glomeruli im AL von *P. apterus*
- Abbildung 11: Volumina der AL verschiedener Insekten im Verhältnis zum Gesamtgehirn in Prozent
- Abbildung 12: Darstellung und Rekonstruktion des Pilzkörpers der Wanze *P. apterus* durch immunhistologische Färbung mit dem Antikörpers R8E6
- Abbildung 13: Volumina der Pilzkörper verschiedener Insekten im Verhältnis zum Gesamtgehirn

## III. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Auflistung der Chemikalien
- Tabelle 2: Auflistung der Lösungen
- Tabelle 3: Auflistung primären Antikörper
- Tabelle 4: Auflistung sekundären Antikörper
- Tabelle 5: Auflistung der Materialien
- Tabelle 6: Auflistung der Software
- Tabelle 7: Volumen und prozentualer Anteil der Neuropile im Gehirn der Landwanze *P. apterus*
- Tabelle 8: Volumen und prozentualer Anteil der Pilzkörperbestandteile im Verhältnis zum gesamten Neuropil des Pilzkörpers

# 1. Einleitung

## 1.1 Zielstellung

Ziel dieser Studie ist die neuroanatomische Analyse über den Aufbau des Gehirns und seiner Neuropile in der Landwanze *P. apterus*. Besonderes Augenmerk gilt dabei dem olfaktorischen System, welches ebenfalls immunhistologisch untersucht werden soll. Dieses Vorgehen ermöglicht die Färbung neuronaler Strukturen durch der in ihnen enthaltenen Neurotransmittern. Durch Anwesenheit dieser können Vergleiche und Unterschiede zu anderen Versuchstieren gezogen werden. Weiterhin soll das Volumen der olfaktorischen Areale am Gesamtgehirn und damit die relative Gewichtung des olfaktorischen Gehirns bestimmt werden.

## 1.2 *Pyrrhocoris apterus*

Die Landwanze *Pyrrhocoris apterus* (*P. apterus*) zählt zu der Familie der Pyrrhocoridae (Feuerwanze), die zur Klasse der Insekten zählt. [1] Die Körperform von *P. apterus* ist oval, wobei die Oberseite flach und die Unterseite gewölbt ist. [1] Der Kopf ist dreieckig und besitzt keine Ocellen. An der Spitze befinden sich zwei vielgliedrige Antennen. Das Halsstück hat einen trapezförmigen Aufbau. *P. apterus* besitzt eine Größe von 6,5-12 mm und ist durch ihr universelles Aussehen leicht zu erkennen. Der Kopf der Wanze ist schwarz, das Halsschild rot, mit einem schwarzen Viereck in seinem Zentrum. Der Thorax des Tieres ist schwarz mit rot-aufliegenden Flügeln. Diese zeigen in ihrer Mitte einen schwarzen Kreis sowie an Spitze, die zum Kopf zeigt (Abb. 1). [6]

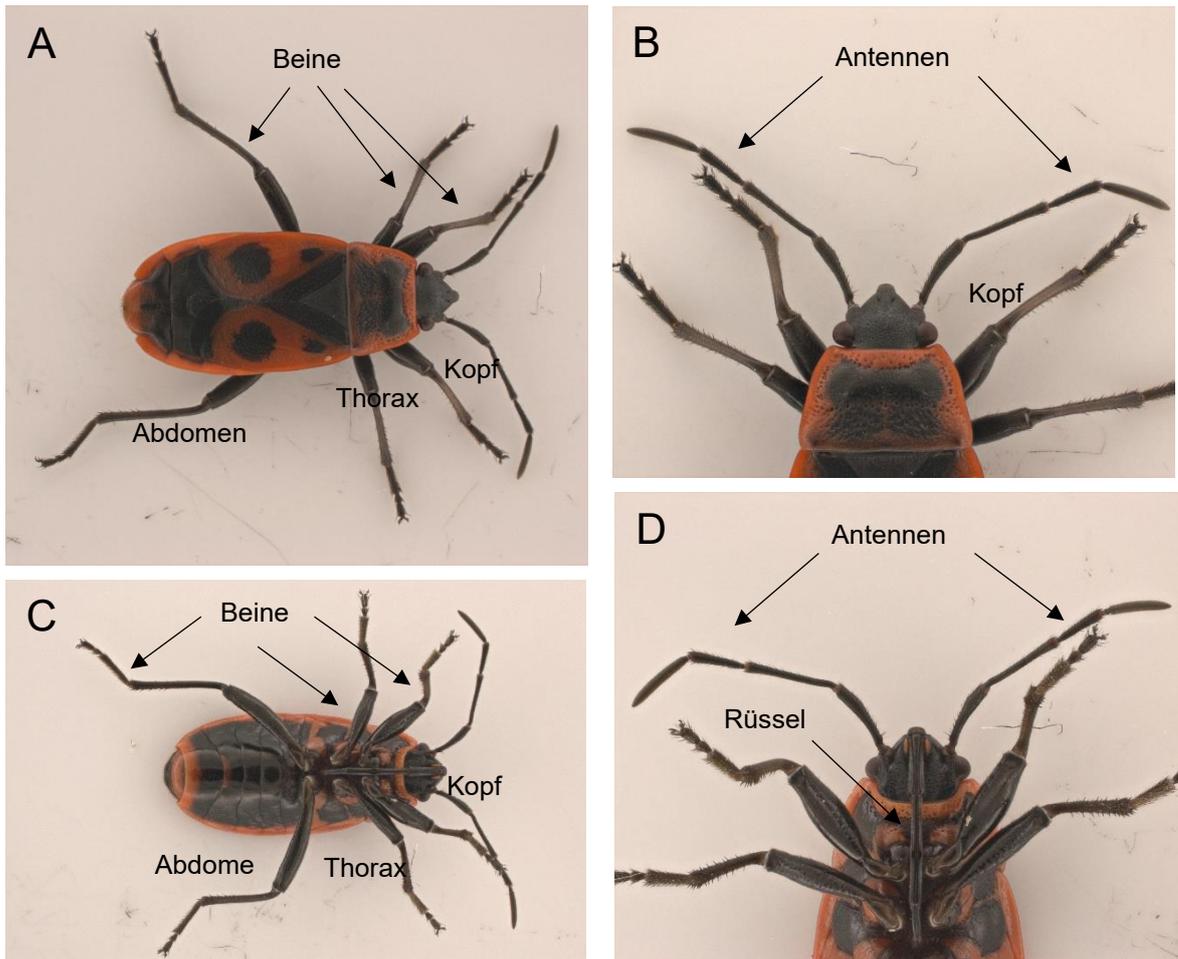
Ihr Lebensraum sind verschiedene Malvaceae, wie Hibiskus oder die Malve. In Europa ist die Wanze gehäuft an Linden anzutreffen, allerdings ist sie auch an Fichten und anderen Bäumen aufzufinden. Die Feuerwanze ist nicht ausschließlich in Europa beheimatet, sondern wurde auch in Ländern des Nahen Ostens bis Pakistan, Russland, Kasachstan und Usbekistan, sowie Teilen der Mongolei und China vorgefunden. [2]

Ihre Ausbreitung hat sich in den letzten Jahren in Skandinavien um 500% gesteigert. [3] Das liegt auch daran, dass die Wanze Temperaturen von bis zu minus 20 und plus 30 Grad überleben kann. Bei sehr kalten Temperaturen ziehen sich die Tiere in die unteren Bereiche der Stämme, Bodenspreu oder Rindenspalten zurück, wo sie große Aggregationen bilden. [4] Diese entstehen durch die Ausschüttung der Aggregationspheromone und der Kontaktpheromone. Beide Düfte lösen eine Bildung der Aggregationen aus [3]. Bei wärmeren Temperaturen verlassen die Tiere ihren Unterschlupf und beginnen mit der Futtersuche. [4]

Die Feuerwanze hat aufgrund ihrer Lebensweise eine sehr trockene Ernährung, diese beruht auf Samen der Bäume, die sie bewohnt und einer zoophagen Ernährung, kleinerer Insekten, sowie dem Kannibalismus. [3]

In den Frühlingsmonaten März und April erfolgt die Paarungszeit. Diese kann von einigen Minuten bis zu Tagen andauern. Die Eiablage erfolgt im April bis Mai, dabei werden die Eier in Intervallen von zwei bis fünf Tagen in Form von Paketen abgelegt. [4] Die Eier werden in kleinen Gruben im Boden abgelegt und von den Weibchen bedeckt. Die Embryonalentwicklung erfolgt in einem Zeitraum von 6-24 Tagen, die abhängig von der Höhe der Außentemperatur ist. Die Feuerwanze durchläuft fünf Larvenstadien, die in

einem Zeitraum von zwei bis drei Monaten erfolgen. Die Lebensdauer der adulten Tiere kann bis zu einem Jahr betragen. [4]



**Abb. 1:** Abbildung des Versuchstieres *P. apterus* (A) dorsale Sicht des gesamten Körpers von *P. apterus* (B) dorsale Sicht auf das Kopfsegment von *P. apterus* (C) ventrale Sicht auf das Versuchstier *P. apterus* (D) ventrale Sicht auf das Kopfsegment von *P. apterus*

### 1.3 Aufklärung der Lage des Gehirns

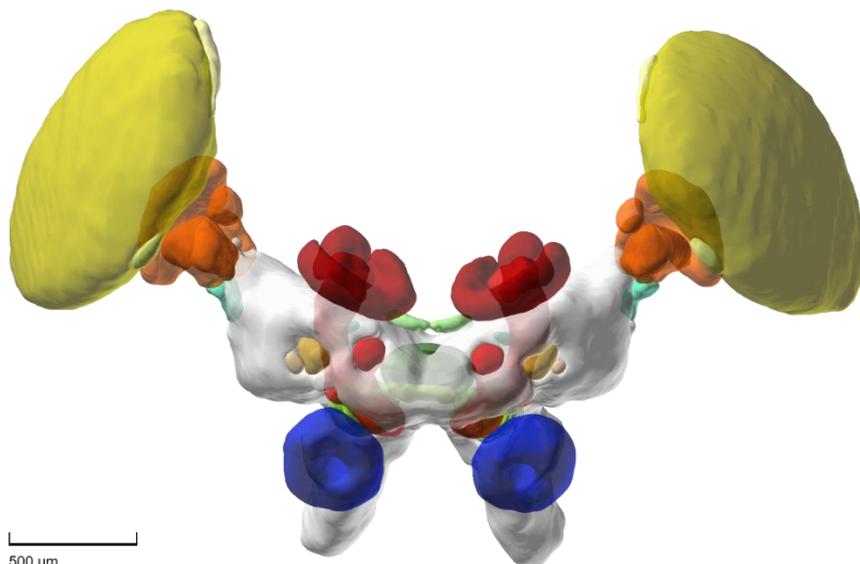
Die Phylogenie der Insekten wurde erstmalig in einer Studie 1916 von Nils Holmgren erwähnt [8]. Aufgrund eines Fossilienfundes des Unterkambrium-Lobopoden *Cardiodictyon catenulum* zeigte sich, was bereits erwartet wurde und zu den Erkenntnissen über die heutigen Insekten passt. Das Nervensystem des Insektes zeigte den Aufbau eines Strickleiter-Nervensystems, welches noch in den heutigen Insekten zu finden ist. [10] Buschbeck erforschte im Jahr 2000 die neuronalen Merkmale im Insektengehirn rezenter und extinkter Arten. Bei ihrer Forschung zeigte sich, dass viele phylogenetischen Informationen über viele Generationen bewahrt werden. [8] Daraus schloss sie, dass Neuronen-Formen und dessen Anordnung aus den Vorfahren konserviert und noch in den heutigen Insekten zu finden sind. [8]. Weiterhin wurde gezeigt, dass das Gehirn keine Segmentierung aufwies. Dies ließ darauf schließen, dass sich die Ganglien und das Gehirn unabhängig voneinander entwickelten und anschließend zusammenwuchsen. Dies beweisen unter anderem auch Studien aus dem Jahr 2005. [9]

Sie zeigten, dass das Gehirn aus einer procephalen neurogenen Region in den Larven und das weitere zentrale Nervensystem (ZNS) aus einer ventralen neurogenen Region im Thorax entstehen und anschließend durch Neurogenese wachsen [10].

Einfluss auf die Entwicklung des Gehirns hat die Lebensweise der Insekten. Diese bedingt spezifische sensorische Signale, die einen Einfluss auf das Gehirn besitzt. So zeigte Farris im Jahr 2015, dass die Größe und Lage des Gehirns im Kopf des Insekts mit der Bedeutung der sensorischen Systeme zusammenhängt. [11]

Die anatomischen Anpassungen im Gehirn zeigen sich in der Morphologie der Neuropile und der Neuraxis, die die Position des gesamten Nervensystems beschreibt und dient der Beschreibung von Gehirnstrukturen. [12] Insekten wie die Heuschrecke *Locusta migratoria* zeigen ein frontal im Kopf liegendes Gehirn, welches durch die Verbindung mit den optischen Loben (OL) in die Breite gezogen wird. [13] Anders ist die Lage des Gehirns in Fliegen, wie *Drosophila melanogaster*, deren Gehirn den Antennen gefolgt leicht nach hinten geneigt und kleiner ist, da sie aufgrund ihrer geringen Größe und Kopfform keinen Raum für ein größeres Nervensystem hat. [14]

## 1.4 Aufbau des Insektengehirns



**Abb 2:** Aufbau des Gehirns der Heuschrecke *Locusta migratoria*. Quelle ( Insect Brain Database (Heinze S, el Jundi B, Berg BG, Homberg U, Menzel R, Pfeiffer K, et al. A unified platform to manage, share, and archive morphological and functional data in insect neuroscience. eLife. 2021;10:e65376) Antennallobus: blau, Medulla: gelb, Lobula: orange und mint, Pilzkörper: rot, , Zentralkörper: hellgrün, grau transparent: protocerebral Loben und Tritocerebrum)

Das Gehirn der Arthropoden wird aus zwei Teilen, dem USG und dem OSG, gebildet. Das OSG in Insekten wird in drei Neuromeren, das Protocerebrum (PB), das Deutocerebrum und das Tritocerebrum eingeteilt. [12]

Den größten Anteil nimmt das PB ein, welches dorsal der Speiseröhre liegt und die OL, den Pilzkörper (MB), den Zentralkomplex und das laterale Horn beinhaltet.

Die OL gelten als primäres visuelles Zentrum, in welchem optische Signale verarbeitet und anschließend zentral weiteleitet werden. Es enthält drei Bestandteile, die Lamina (La), Medulla (Me) und die Lobula (Lo). Diese kann weiterhin eingeteilt werden in einen vorne liegenden, einen dorsal-liegenden, einem inneren und äußeren Loben. Die Verarbeitung der Informationen erfolgt im medial liegenden Teil des PB den optischen Tuberkeln den MB und dem Zentralkörper (CB). Diese Strukturen liegen anterior und dienen der Verarbeitung visueller Signale, wie die Erkenntnis über Formen und verschiedenen Farben. [15]

Zum PB gehören die MB, bestehend aus den Loben, dem Calyx und dem Pedunkulus. Die MB besitzen eine hohe Dichte an Neuronen, die dicht gepackt parallel verlaufend vom Calyx durch den Pedunkulus in die Loben führen. Diese Neurone werden Kenyon-Zellen genannt. Der MB bildet eine eigene Struktur und ist umgeben von Glia Zellen, die ihn von anderen Neuropilen abgrenzt.

Durch eine Verbindung der Projektionsneuronen (PN) des Antennallobus (AL) in den MB, ist dieser ein olfaktorisches Neuropil. Dabei senden die PN olfaktorischen Signale aus dem AL zum MB, der diese verarbeitet. Durch Studien an der Honigbiene fand u.a. die Arbeitsgruppe um Randolph Menzel heraus, dass der MB ebenfalls bei der Kodierung, Speicherung und dem Abrufen von Geruchs-Informationen benötigt wird. [16]

Der Zentralkomplex dient der Orientierung und spielt eine Rolle bei der Koordinierung, Migration und Orientierung, sowie vor allem der visuellen sensorischen Informationsverarbeitung. [17] Er liegt zentral im Gehirn und besteht aus der Protocerebralbrücke, dem CB und den Noduli, welche posterior liegende Strukturen sind, die der Bewegungskoordination dienen. Der CB gliedert sich in den ellipsoiden und den fächerförmigen Körper und dient der Koordinierung. [18].

Das Deutocerebrum ist eine Teilstruktur des Gehirns, das zur funktionellen Verarbeitung sensorischen Informationen dient. Es beinhaltet die dorsalen Loben (AMMC), die mechanosensorischen Informationen verarbeiten, sowie die AL, die der olfaktorische Verarbeitung von Informationen dienen. [19] Dabei entspricht seine Funktion dem Riechhirn der Wirbeltiere. Seinen universellen Aufbau erhält er durch viele kleine runde Strukturen, die olfaktorische Glomeruli genannt werden. Diese beeinflussen Größe und Form und unterscheiden sich je nach Funktion. Sie bilden die funktionelle Einheit des AL, indem sie olfaktorische Informationen verarbeiten und durch PN in höhere Verarbeitungszentren, wie den MB, weiterleiten. Für die Unterscheidung der olfaktorischen Sinneseindrücke kommunizieren Glomeruli in einem Netzwerk aus Interneuronen, welches zwischen ihnen verschaltet ist. [20]

Der Dorsallobus ist für die Verarbeitung von mechanosensorischen Informationen verantwortlich, in ihn innervieren die aus den basalen Segmenten der Antennen kommenden mechanosensorische Signale. Durch eine Fusionierung mit dem PB ist der Dorsalloben nicht klar vom PB abzugrenzen. [21]

Das Tritocerebrum liegt im hinteren Teil des Gehirns und dient der Versorgung der Motoneurone des Labrums. Die aus ihm kommende Nerven verbinden das Oberschlundganglion (OSG) mit dem Unterschlundganglion (USG). Über seine Funktionen ist zurzeit noch nicht viel bekannt. [12]

Das USG ist eine Fusion der mandibularen, maxillaren und labialen Ganglien und ist in den meisten Arthropoden mit dem OSG zusammengewachsen. Seine Funktion ist die Kontrolle der motorischen und sensorischen Bewegung der Mundwerkzeuge und der Kopfbewegung. [21] (Abb. 2)

## 1.5 Geruchssinn von Insekten

### 1.5.1 Antennen

Die Antennen sind segmentierte Anhänge am Kopf des Insekts, sie sind länglich und zylindrisch und können in drei Teile unterteilt werden. Der Stiel befindet sich am Kopf des Tieres und sorgt durch Muskeln für die Bewegung des Folgegliedes. Als Pedinkel wird das zweite Glied bezeichnet. Die letzten Glieder werden Geißel genannt und sind der variabelste Teil. Jedes Glied ist durch einen Muskel mit dem vorherigen und nachfolgendem verbunden, wodurch eine große Beweglichkeit erreicht wird [22] Die Antennen sind ein wichtiges sensorische Organ der Insekten dienen der Aufnahme von sensorischen Umwelteindrücken, wie die Wahrnehmung von Duftstoffen. [23] Dazu befinden sich auf ihrer Oberfläche verschiedene Chemo- und Mechanorezeptoren, mit denen sie Moleküle aufnehmen. Diese Transduktion erzeugt eine Kodierung in Form von Aktionspotenzialen, die anschließend ins Gehirn weitergeleitet werden. [24]

### 1.5.2 Sensillen

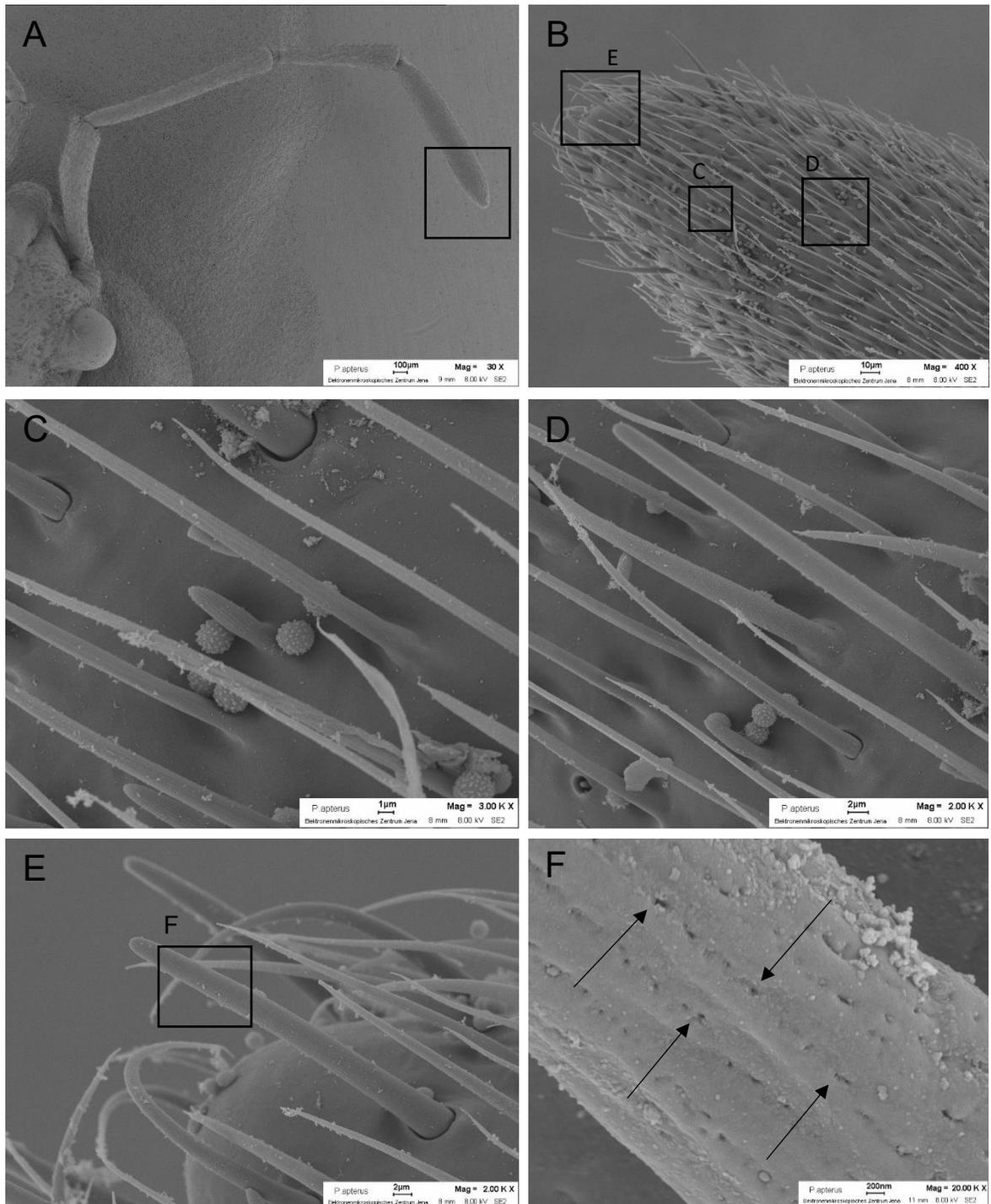
Sinneseindrücken, wie Gerüche, werden von Insekten durch kleine Riechhaare, die sich auf der Oberfläche des gesamten Körpers befinden und gehäuft auf Antennen, Palpen und Beinen vorkommen, wahrgenommen. [24] Diese werden als Sensillen bezeichnet. Sie unterscheiden sich aufgrund ihrer Funktion, dabei lassen sie sich durch Unterschiede in Länge, Form und Struktur differenzieren. [25] (Abb. 3)

Chemosensillen sind für die Wahrnehmung von chemischen Reizen wie Gerüche verantwortlich. Die olfaktorischen Chemosensillen unterscheiden sich in ihrer Morphologie und ihrer Funktion, es lassen sich trichodea, basiconica und coeloconica Sensillen differenzieren. Der Korpus der Trichodae ist ein schlanker Kegel, seine Funktion gilt der Wahrnehmung von Pheromonen. Die Basiconica verkörpert ein breiter Kegel und besitzt zusammen mit den grubenartigen Coeloconica die Aufgabe der allgemeinen Duftstoffverarbeitung. [26] Alle olfaktorischen Chemosensillen enthalten Poren, die der Aufnahme von Duftstoffmolekülen dienen. (Abb. 3)

Mechanosensillen dienen der Wahrnehmung mechanischer Reize und Thermosensillen nehmen Veränderungen der Temperatur wahr. Beide besitzen keine Poren auf ihrer Oberfläche. (Auf Unterschiede der Untergruppen der Thermo- und Mechanosensillen wird in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen.)

In jeder Sensille sind mehrere Sinneszellen, welche für die Weiterleitung von elektrischen Potentialen zuständig sind, die an der Sensille durch einen spezifischen Reiz ausgelöst werden.

Die Sinneszellen werden von einem schützenden Belag umhüllt, der für die Aufrechterhaltung der Zusammensetzung der Sensillenlymphe zuständig ist. Dieser umfasst die thekogenen, tormogene und trichogene Stützzellen. [26]



**Abb. 3:** Darstellung der Sensillen auf der Antenne der Landwanze *P. apterus* (A, B) Darstellung der gesamten Antenne und der Antennenspitze (C,D) Darstellung der verschiedenen Sensillentypen (E) Darstellung einer olfaktorischen Sensille (F) Oberfläche einer olfaktorischen Sensille, inklusive der Poren, die dem Eintritt der Geruchsmoleküle dienen

### 1.5.3 Neuronen

Das Nervengewebe in Insekten besteht aus verschiedenen Nervenzellen. (Der Aufbau einer Nervenzelle wird im Folgenden nicht erklärt.) Dabei können Neurone nach ihrer Funktion eingeordnet werden. Es unterscheiden sich hierbei die Interneurone, die PN, die sensorischen Neurone und die Motoneurone. Interneurone sind multipolare Neurone, die elektrische Signale über kurze Strecken hinweg leiten können. Die multipolaren PN leiten das Aktionspotential über lange Strecken von einem Neuropil ins nächste. Sensorische Neuronen leiten die erhaltenen Signale an das ZNS, während Motoneuronen Signale vom ZNS erhalten und diese an ihre motorischen Ziele weiterleiten. [27]

### 1.5.4 Olfaktion

Der Geruchssinn von Insekten gilt als eines der essenziellsten Sinne und dient der Auffindung möglicher Sexualpartner, Nahrung und dem Überleben der Tiere [26].

Insekten nehmen Gerüche mittels, der auf ihren Antennen befindenden, olfaktorischen Sensillen wahr. Diese besitzen auf ihrer Kutikula viele Poren, wodurch die Duftmoleküle in sie eindringen können. Im Inneren der Sensillen befindet sich eine proteinhaltige Lymphe, diese besteht aus Bindeproteinen, welche von den thomogenen und trichogenen Stützzellen gebildet werden [26], sowie die Dendriten der Neurone. Durch diese wird ein Aktionspotential ausgelöst, welches an das olfaktorische Zentrum weitergeleitet wird. [29] Der Duftstoff bindet an die Rezeptoren der Dendriten und sorgt für einen Ioneneinstrom, welcher zu einer Depolarisation am Axonhügel führt, die ein Aktionspotential zur Folge hat. Dieses wird über das Axon in den AL projiziert. Dort befinden sich die kugelförmigen Glomeruli, die durch lokale Interneurone miteinander verschaltet sind. Das prozessierte Signal wird anschließend an die PN weitergeleitet, die in höhere olfaktorische Gehirnzentren projizieren, wie das laterale Horn und die MB. Dort erfolgt die Verarbeitung der Informationen und die Auswertung des Duftstoffes. [28]

## 1.6 Neurotransmitter

### 1.6.1 Neurotransmitter, Neuromodulatoren und Neurohormone

Für die Kommunikation zwischen Neuronen dienen Neurotransmitter, Neuromodulatoren und Neurohormone [31]. Neurotransmitter sind chemische Botenstoffe, die der Weiterleitung eines Signals dienen. [32] Sie werden von der Präsynapse bis zur Ankunft eines Aktionspotentials in Vesikeln aufbewahrt, und anschließend in den synaptischen Spalt entlassen. Dort binden Neurotransmitter an die postsynaptischen Rezeptoren und sorgen für den Einstrom von Ionen durch die Öffnung der Ionen Kanäle. Dabei bestehen Neurotransmitter und Neuromodulatoren aus biogenen Aminen, einzelnen Aminosäuren und Peptiden. Die im Gehirn vielfach vorkommenden Neurotransmitter sind  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), Acetylcholin und Glutamat. [33]

Neuromodulatoren sorgen durch eine Bindung an den G-Protein gekoppelten Rezeptor an der Postsynapse für eine Signalkaskade, die sich zu einem Aktionspotential entwickeln kann. Histamin, Serotonin und Dopamin sind häufig vorkommende Neuromodulatoren. [33] Neurohormone sind Hormone, die von Neuronen in das umliegende Gewebe abgegeben werden.

### 1.6.2 Neurotransmitter in Insekten

Biogene Amine kommen in Insekten und Wirbeltieren als Neurotransmitter und Neuromodulatoren vor. Zu ihnen gehören Serotonin, Dopamin Octopamin, Histamin und Acetylcholin [34]. Sie haben vielfältige Funktionen im ZNS und kommen in geringen Mengen auch als Neurotransmitter vor. Serotonin wirkt in Motoneuronen der Muskelkontrolle, im OL und im Zentralkomplex. [34] Dopamin steuert die adipokinetischen Hormone und sorgt für die Fettverteilung im Körper. Octopamine sind im OL zu finden und lassen sich in wenigen Fasern im PB nachweisen. [35] Histamin lässt sich in den Fotorezeptoren des OL nachweisen und ist in wenigen Interneuronen festgestellt worden. [36] Ein wichtiger aktivierender Neurotransmitter ist Acetylcholin. Acetylcholin dient als Neurotransmitter in mechanosensorischen und chemosensorischen Nervenzellen. Dabei ist seine Hauptaufgabe die Steuerung von Muskelkontraktion. Vereinzelt kommt Acetylcholin im OL und den MB vor. [32]

Die Neurotransmitter, die im Gehirn wichtige Funktionen besitzen, sind die Aminosäuren Gamma-Aminosäure (GABA) und Glutamat. Der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter ist die Gamma-Aminosäure. Sie kommt in den lokalen Interneuronen des Gehirns vor und ist vermehrt im primären olfaktorischen Verarbeitungszentrum der Insekten zu finden. Glutamat lässt sich in den Motoneuronen der Insekten nachweisen und sorgt für eine Kontraktion der Muskeln. [37]

## 1.7 Hypothese

Aufgrund seines Aufbaus wird das Nervensystem der Insekten als Strickleiternnervensystem bezeichnet. Das Gehirn, welches sich aus OSG und USG zusammensetzt, liegt meist zentral in der Kopfkapsel, wo es mit den Ganglien verbunden ist, die sich horizontal in den Körper ziehen. [12] Die Ganglien sind jeweils über zwei Konnektive miteinander verbunden, sodass diese den Anschein von Sprossen einer Leiter machen. Ausgehend von Untersuchungen der Heuschrecken (*Acrididae*), den Bienen (*Apis mellifera*) und anderen Insekten wurden verschiedene Anzahlen an Ganglien festgestellt, die miteinander verwachsen sein können. [21]

Die Schildwanzen, *Pentatomidae*, gehört wie *P. apterus* zu der Ordnung der Hemipteren, bei dieser sind alle thorakal und abdominal Ganglien zusammengewachsen. Weiterhin zeigt sich eine vollständige Verschmelzung des Ober- und Unterschlundganglions (USG) zum Gehirn. [21] Durch die Verwandtschaft der Arten wird erwartet, dass die thorakal und abdominal Ganglien der Feuerwanze *P. apterus* sich ebenfalls nicht mehr in viele Sprossen unterteilen, sondern zu einem oder wenigen Ganglien zusammengewachsen sind. Weiterhin wird eine Verschmelzung des OSG und USG erwartet, wie es auch in anderen Hemipteren vorgefunden wurde. [38] Die Lage wird in der Kopfkapsel zwischen den Augen des Tieres erwartet, von wo die über Konnektive verbundenen Ganglien in den Thorax führen.

Durch Untersuchungen des Aufbaus verschiedener Insekten Gehirne wurde festgestellt, dass diese die gleichen Neuropile besitzen, die sich aufgrund der Nischenbildung unterschiedlich ausprägen können. *P. apterus* gehört zur Familie der Pyrrhocodidae, die unter die Klasse der Insekten fällt. Auf Grundlage dessen wird erwartet, dass die Wanze ebenfalls mit diesen Neuropilen ausgestattet ist.

*P. apterus* gilt als soziales und kommunikatives Insekt, welches große Aggregationen bildet, die für ein soziales Miteinander stehen. [2] Diese lassen sich mit dem Zusammenfinden der Bienen vergleichen. Bienen gelten als sehr soziale Insekten. Untersuchungen ergaben dass diese Eigenschaft ebenfalls Einwirkungen auf ihr Gehirn hinterließen. Die Bienen zeigten die Neuropile, wie sie auch in anderen Insekten vorzufinden sind, allerdings ließen sich in der Größe einiger Neuropile große Unterschiede feststellen. Die MB der Bienen sind im Verhältnis zu anderen Insekten sehr groß, dies liegt daran, dass dieser als Verarbeitungszentrum der sensorischen Informationen gilt. [39] *P. apterus* zeigt durch seine Aggregationsbildung ebenfalls ein sehr soziales Verhalten, es wird vermutet, dass der MB der Wanze ebenfalls verhältnismäßig groß sein sollte.

In Insekten gilt der AL als primäres olfaktorisches Zentrum. Auf diesen werden die durch Chemosensillen Gerüche aus der Umwelt als Signale projiziert. Insekten sind in der Lage auch Pheromone und Futter über weite Strecken wahrzunehmen. Bei Vergleichen wurde festgestellt, dass der AL der Wanze *Apolygus lucorum* (im Vergleich zu anderen Insekten sehr groß ist). Das lässt darauf schließen, dass die Olfaktion ein wichtiges Sinnesorgan für einige Wanzen darstellt. Aufgrund der Aggregationsbildung bei *P. apterus*, die durch Pheromone anderer Tiere der gleichen Art wahrgenommen wird, wird vermutet, dass auch *P. apterus* ein olfaktorisch geprägtes Insekt ist.

## 2. Methoden und Materialien

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

**Tab. 1:** Auflistung der Chemikalien

| Chemikalie                                | Hersteller                 |
|---|----------------------------|
| Ethanol                                   | Roth, Deutschland          |
| Glycerol                                  | Roth, Deutschland          |
| Paraformaldehyd                           | Roth, Deutschland          |
| Phosphate buffered saline                 | Sigma Aldrich, Deutschland |
| Methylsalicylat                           | Sigma Aldrich, Deutschland |
| Triton X-100                              | Sigma Aldrich, Deutschland |
| Lucifer Yellow                            | Sigma Aldrich, Deutschland |
| Tetra-methyl-rhodamine dextran mit biotin |                            |
| Sulforhodamin 101 Sulfonylchlorid         |                            |
| Normal Goat Serum                         | Cell Signaling, USA        |

#### 2.1.2 Lösungen

**Tab. 2:** Auflistung der Lösungen

| Lösungen | Beschreibung                      | Aufbewahrung |
|----------|-----------------------------------|--------------|
| PFA      | 4% Paraformaldehyd                | -20°C        |
| PBS      | 0.1 M Phosphat-gepuffertes Saline | 4°C          |
| PBSTx    | 0.2% Triton X-100 in 0.1 PBS      | 4°C          |

#### 2.1.3 Primäre Antikörper

**Tab. 3:** Auflistung primären Antikörper

| Primärer Antikörper               | Hersteller | Aufbewahrung |
|-----------------------------------|------------|--------------|
| Mouse anti Synapsin (3C10 Synorf) | DSHB       | -20°C        |
| Polyclonal Rabbit anti GABA       | Sigma      | -20°C        |
| Rabbit anti-Serotonin             | Diasorin   | -20°C        |
| Mouse R8E6                        | Uli Müller | 4°C          |

## 2.1.4 Sekundäre Antikörper

**Tab. 4:** Auflistung sekundären Antikörper

| Sekundärer Antikörper | Absorption in nm | Herstellung            |
|-----------------------|------------------|------------------------|
| Goat Anti mouse       | 546              | Invitrogen, USA        |
| Goat Anti mouse       | 488              | Invitrogen, USA        |
| Goat Anti rabbit      | 488              | Invitrogen, USA        |
| Goat Anti rabbit      | 568              | Life Technologies, USA |

## 2.1.5 Materialien

**Tab. 5:** Auflistung der Materialien

| Materialien und Geräte               | Herstellung                    |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| Skyscan 221                          | Bruker, USA                    |
| Axio Zoom V16                        | Carl Zeiss, Deutschland        |
| LSM 880                              | Carl Zeiss, <u>Deutschland</u> |
| ComputerTomograph SkyScan 1272       | Bruker, USA                    |
| Imager M2                            | Carl Zeiss, Deutschland        |
| Stereomikroskop                      | Olympus, Japan                 |
| Rasterelektronenmikroskop            |                                |
| Pipetten                             | GILSON, USA                    |
| Skalpell                             | GRIFF INDUSTRIES, England      |
| Scheren                              | FST, Deutschland               |
| Pinzetten                            | Dumont, Schweiz                |
| Rasierklingen                        | Personna, USA                  |
| Medizinische Spritzen                | B-BRAUN, Deutschland           |
| Glasbehälter                         | VWR, Deutschland               |
| Wachsbehälter                        | TPP, Schweiz                   |
| Objektträger                         | Roth, Deutschland              |
| Deckgläschen                         | Roth, Deutschland              |
| Reaktionsgefäße verschiedener Größen | Roth, Deutschland              |
| Zahnstocher                          |                                |
| Rotationsmischer                     |                                |
| Kreisschüttler KS260                 | IKA, Deutschland               |
| Waage                                | Sartorius, Deutschland         |
| Labornetzgerät                       | VOLTKRAFT, Deutschland         |

## 2.1.6 Software

**Tab. 6:** Auflistung der Software

| Software             | Version       |
|----------------------|---------------|
| Amira                | 5.6.0         |
| Mendeley             | 2.90.0        |
| Microsoft Office 365 | Microsoft 365 |
| Zeiss Zen 2          | 2.0.0.0       |
| ImageJ               | 1.53t         |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Computertomographie

Das Tier wurde in ein Gläschen gebracht und anschließend mittels einer aufsteigenden Ethanol Reihe je zehn Minuten dehydriert (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 99,8% ,100%, 100%). Nach der Dehydrierung wurde das Tier in 0,15%igem Iod in einer 100%igen Ethanollösung für zwei Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde das Tier mit einer Pixelgröße von 5µm pro Pixel durch den ComputerTomograph SkyScan 1272 gescannt.

### 2.2.2 Präparation des Gehirns

Das lebende Tier wurde in Wachs eingebettet. Zur Fixierung diente eine 4%ige PFA-Lösung, die auf das zuvor geöffnete Kopfsegment aufgetragen wurde. Die Lösung wirkte für 20min bei Raumtemperatur ein. Nach der Fixierung wurde die PFA- Lösung entfernt und mittels einer PBS-Lösung ersetzt. Anschließend erfolgte die Präparation des Gehirns aus dem Kopf des Tieres. Dazu wurde das Gehirn von Muskeln und Tracheen befreit und dem Kopf des Tieres entnommen. Für eine erfolgreichere Penetration des PFAs wurden die Nervenenden abgeschnitten. Anschließend wurden die Gehirne über Nacht in einer 4%igen PFA-Lösung im Kühlschrank bei 4 Grad fixiert.

### 2.2.3 GABA und Synapsin

Nach der Präparation und Fixierung der Gehirne (Versuch Präparation des Gehirns) wurden die Gehirne für 20min unter ständigem Schütteln mit PBS gewaschen. Diese Reinigung wurde drei Mal durchgeführt. Nach Entfernung der PBS Lösung wurden die Gehirne über Nacht bei Raumtemperatur und unter ständigem Schütteln in PBSTx-NGS Lösung blockiert. Am nächsten Tag erfolgte die Entfernung der Lösung und die Zugabe der primären Antikörper Lösung, diese beinhaltet 2 µl Synorf1 (bei einer Verdünnung von 1:30) und 0,5 µl anti-rabbit GABA (bei einer Verdünnung von 1:1000) zusätzlich beinhaltete die Lösung 5 µl PBSTx- NGS. Die primäre Antikörper Lösung wurde bei 4 Grad 72h unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und erneut mit einer PBSTx-NGS Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach Entfernung der Lösung wurden die Gehirne sechsmal zehn Minuten in 500µl 0.1M PBSTx-Lösung gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation in der sekundären Antikörper-Lösung, diese beinhaltete 2µl Alexa Fluor goat anti-rabbit 568 nm und 2µl Alexa Fluor goat anti-mouse 488 nm in einer 1:200fachen Verdünnung mit PBSTx Lösung. Die sekundäre Antikörper Lösung wurde für 72h bei 4 Grad unter ständiger Durchmischung inkubiert.

## 2.2.4 Serotonin

Nach der Präparation und Fixierung der Gehirne (Versuch: Präparation des Gehirns) wurden die Gehirne für 20min unter ständigem Schütteln mit PBS gewaschen. Diese Reinigung wurde drei Mal durchgeführt. Nach Entfernung der PBS Lösung wurden die Gehirne über Nacht bei Raumtemperatur und unter ständigem Schütteln in PBSTx-NGS Lösung blockiert. Am nächsten Tag erfolgte die Entfernung der Lösung und die Zugabe der primären Antikörpers Rabbit anti-Serotonin Lösung, diese beinhaltet 5 µl dieser (bei einer Verdünnung 1:500) zusätzlich beinhaltet die Lösung 5 µl PBSTx- NGS. Die primäre Antikörper Lösung wurde bei 4 Grad 72h unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und erneut mit einer PBSTx-NGS Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach Entfernung der Lösung wurden die Gehirne sechsmal zehn Minuten in 500µl 0.1M PBSTx-Lösung gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation in der sekundären Antikörper-Lösung, diese beinhaltet des sekundären Antikörper goat-anti rabbit 568 in einer\_1:200fachen Verdünnung mit PBSTx Lösung. Die sekundäre Antikörper Lösung wurde für 72h bei 4 Grad unter ständiger Durchmischung inkubiert.

## 2.2.5 R8E6

Nach der Präparation und Fixierung der Gehirne (Versuch: Präparation des Gehirns) wurden die Gehirne für 20min unter ständigem Schütteln mit PBS gewaschen. Diese Reinigung wurde drei Mal durchgeführt. Nach Entfernung der PBS-Lösung wurden die Gehirne über Nacht bei Raumtemperatur und unter ständigem Schütteln in PBSTx-NGS Lösung blockiert. Am nächsten Tag erfolgte die Entfernung der Lösung und die Zugabe 5 µl (bei einer Verdünnung 1:500) der primären Antikörpers Mouse R8E6 Lösung, zusätzlich beinhaltet die Lösung 5 µl PBSTx- NGS. Die primäre Antikörper Lösung wurde bei 4 Grad 72h unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und erneut mit einer PBSTx-NGS Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach Entfernung der Lösung wurden die Gehirne sechsmal zehn Minuten in 500µl 0.1M PBSTx-Lösung gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation in der sekundären Antikörper-Lösung, diese beinhaltet des sekundären Antikörper Goat Anti mouse 546 in einer 1:200fachen Verdünnung mit PBSTx Lösung. Die sekundäre Antikörper Lösung wurde für 72h bei 4 Grad unter ständiger Durchmischung inkubiert.

## 2.2.6 CLSM-Scan

Jedes zuvor präparierte Gehirn wurde in einer 0,1M PBS Lösung dreimal für 20 Minuten gewaschen, anschließend wurde das Gehirn je zehn Minuten in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 99,8% ,100%, 100%). Das Gehirn wurde nach der Dehydrierung zur Aufklärung in Methylsalicylat eingebettet. Für den Scan wurde das Gehirn auf einen Objektträger gelegt, wo es mit Methylsalicylat bedeckt wurde. Der Scan erfolgte mit einem Konfokalen Lasermikroskop. Dabei wurde der Scan mit verschiedenen Objektiven, der Vergrößerung 10x, 10w, 20w und 40w, durchgeführt. Der Scan erfolgte mit einem Argon Fluoreszenzlasers bei 488nm und/oder einem Helium/Neon Laser bei 543 nm. Die Nadellöcher wurden während des Scans auf eine airy unit eingestellt.

Die Abstände zwischen den Schnitten wurde adaptiv gewählt und betragen zwischen 0,5 bis 3µm, diese Einstellung unterschied sich aufgrund der Gehirne, der Apparatur und der Auflösung.

### 2.2.7 Rekonstruktion

Für die dreidimensionale Rekonstruktion wurde die Software Amira genutzt, da diese der Darstellung von Tiefenkarten dient. Für die Rekonstruktion der Gehirnneuropile wurden die durch den Konfokalen Lasermikroskop Scan erzeugten Bilder markiert und durch eine Interpolation zu dreidimensionalen Daten verfasst. Anschließend wurde mit Hilfe des Werkzeuges der Generierung einer Oberfläche die verschiedenen Neuropile dargestellt. Aus diesen wurde durch eine Volumenmessung das Volumen der Neuropile berechnet.

Bei der Rekonstruktion zweidimensionaler Daten wurde mithilfe der Software ImageJ gearbeitet. Diese Software dient zur Verbesserung der Bilder bezüglich des Kontrastes und der Helligkeit. Im Anschluss wurden die bearbeiteten Daten in der Software Amira ausgewertet und markiert.

### 3. Ergebnisse

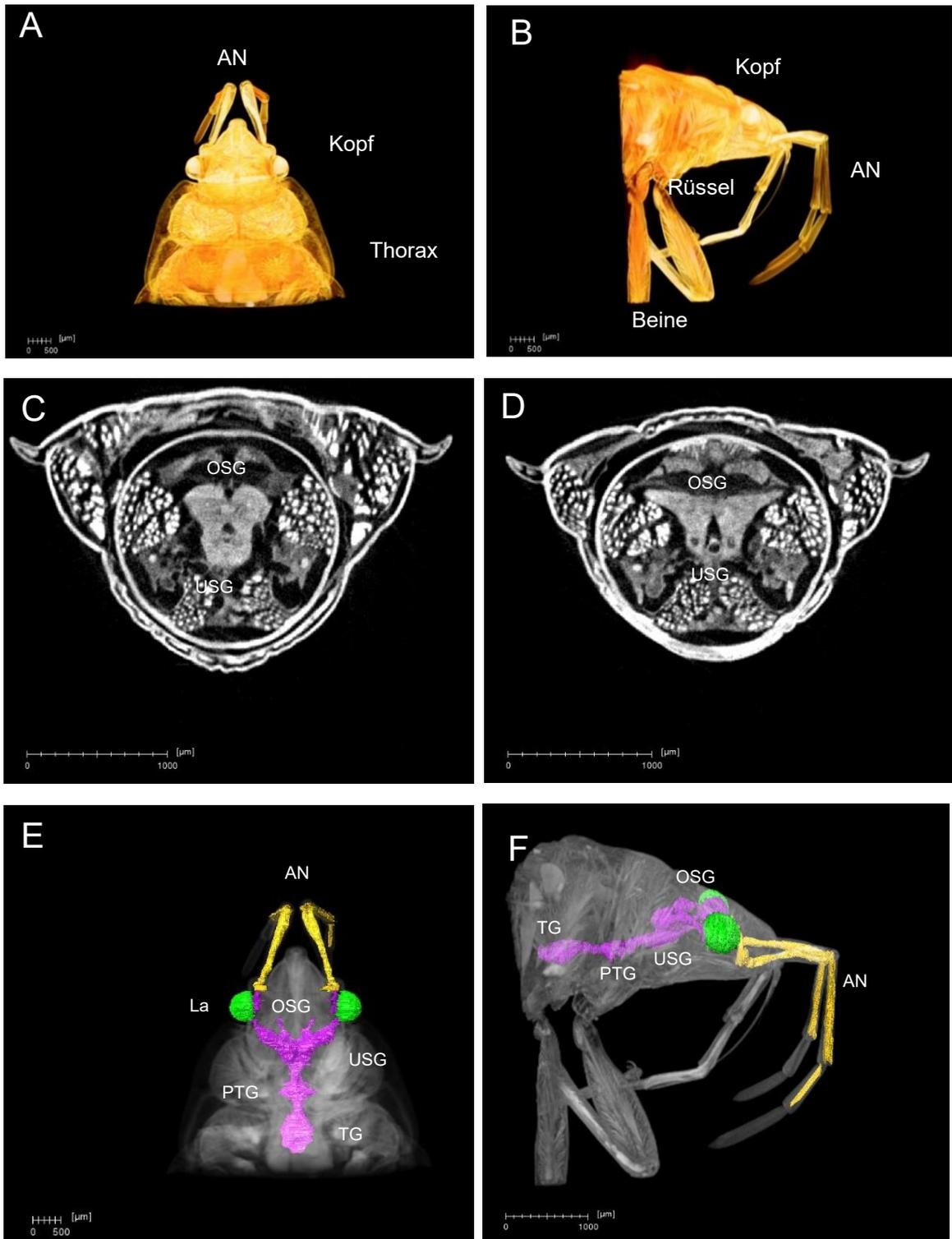
Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Lage und dem Aufbau des Gehirns in der Landwanze *Pyrrhocoris apterus* (*P. apterus*). Diese wurden mittels einer Computertomographie (CT) und einer anschließenden 3D Rekonstruktion der Software AMIRA ermittelt. Weiterhin wurden die olfaktorischen Gehirnareale durch immunhistologische Verfahren beschrieben. Durch Färbungen des Antikörpers Synapsin sollten die Neuropile aufgezeigt und anschließend über eine Rekonstruktion die Gehirnareale dargestellt werden. Die immunhistologische Einordnung der olfaktorischen Gehirnareale wurden mit Hilfe der Antikörper  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), Synapsin und Serotonin vorgenommen. Für eine Einordnung der olfaktorischen Verschaltungszentren wurde zusätzlich der Antikörper R8E6 verwendet, welcher gegen eine Proteinkinase wirkt, die vermehrt in den Pilzkörpern (MB) der Insekten vorliegt.

#### 3.1 Lage des Gehirns

Das Gehirn der Landwanze liegt im zylindrischen Kopf des Tieres. An der Spitze des Kopfsegments zeigen sich zwei längliche Antennen. (Abb. 4)

Im Kopfsegment der Wanze liegt das Gehirn, aufgespannt zwischen den beiden Augen und dem sich im Thorax befindenden Ganglion, hat es die Form eines Dreiecks. Dieses wird durch den Ösophagus mittig getrennt und besteht aus der Verschmelzung von Oberschlundganglion (OSG) und Unterschlundganglion (USG). Weiterhin lässt sich eine Verschmelzung des Meso- und Metathorakalganglion zum zweiten Thorakalganglion (TG) feststellen, welches im Thorax liegt und sich zwischen den ersten paarigen Beinen befindet. Dieses ist über zwei Konnektive mit dem Prothorakalganglion (PTG) verbunden und zeigt weitere Nervenverbindungen in laterale Richtung. Die abdominalen Ganglien zeigen ebenfalls eine Verschmelzung auf und liegen im Abdomen des Tieres, wo sie über Tracheen in Position gehalten werden. Von ihnen ziehen Nerven in laterale Richtung. Die Augen des Tieres sind über die optischen Loben (OL), die lateral am OSG angebunden sind, mit dem Gehirn verbunden.

Die Neuraxis der Landwanze *P. apterus* befindet sich auf der Horizontalachse und erfährt im Bereich des Kopfsegmentes eine leichte dorsale Ausrichtung. Das OSG zeigt eine Ausbreitung in anteriore Richtung, sowie eine laterale Ausbreitung zu den OL. Die Antennennerven sind mit dem Gehirn verbunden und entspringen dem dorsalen Teil des OSGs. (Abb. 4)

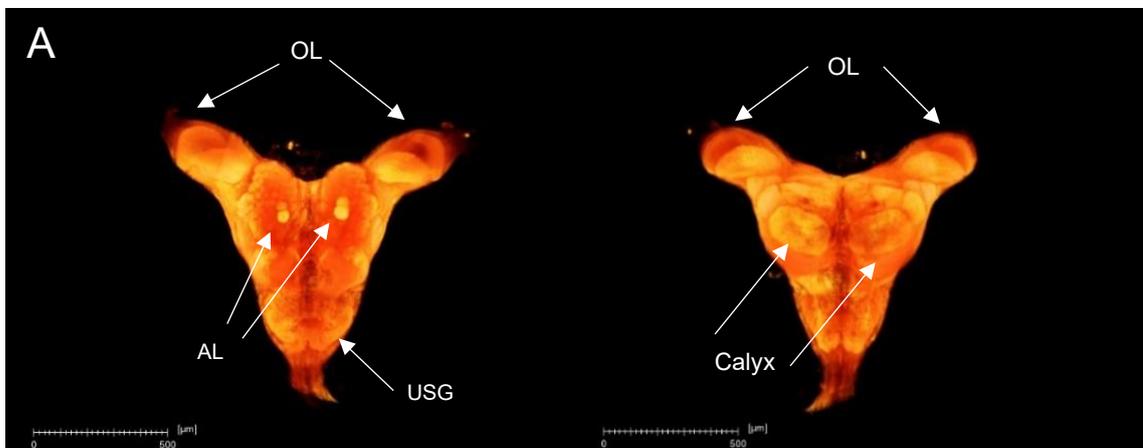


**Abb. 4:** CT- Darstellung des Kopfes von *P. apterus* und Rekonstruktion der Lage des Gehirns (A) dorsale Sicht des durch den CT gescannten Körper von *P. apterus* (B) laterale Ansicht des durch CT gescannten Bereiches von *P. apterus* (C, D) Abschnitte des Gehirns von *P. apterus* (E) dorsale Sicht auf das rekonstruierte Gehirn von *P. apterus* (F) laterale Ansicht auf das rekonstruierte Gehirn von *P. apterus*

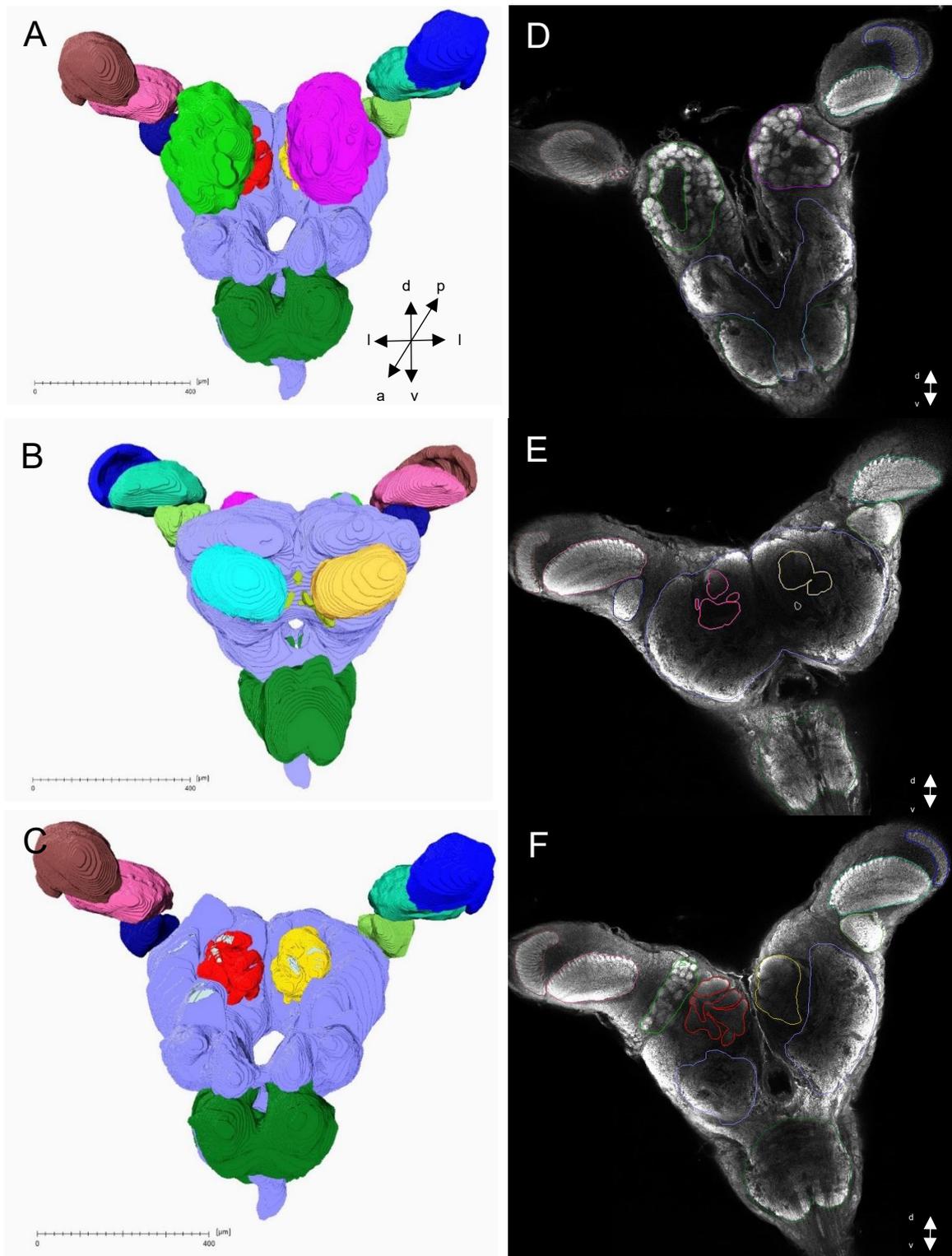
## 3.2 Aufbau des Gehirns

Die Rekonstruktionen (Abb. 5 und 6) zeigen die Neuropile der Landwanze *P. apterus*. In der ventralen Ansicht lassen sich verschiedenen Neuropile unterscheiden. (Abb. 5) Das Gehirn der Wanze zeigt einen spiegelsymmetrischen Aufbau und wird zentral vom Ösophagus durchzogen und sich aus USG und OSG zusammensetzt. Dieses untergliedert sich seinerseits in drei Bereiche die als Protocerebrum (PB), Deutocerebrum und Tritocerebrum bekannt sind. Das PB nimmt den anteilig größten Bereich ein und liegt mittig des OSG, wo es viele Neuropile vereinigt. Das Deutocerebrum liegt im ventralen Bereich und beinhaltet die Antennalloben (AL). Unterhalb des PBs liegt das Tritocerebrum, welches durch zwei beidseitig hervortretende Höcker zu erkennen ist.

Die zum Deutocerebrum gehörenden AL zeigen sich superior aufgesetzt auf das PB als Höcker. Unterhalb dessen lassen sich die gefächerten Loben der MB erkennen. Diese sind durch den Pedunkulus, mit dem inferior liegenden Calyx verbunden. Zentral dem OSG liegt der Zentralkörper (CB), dieser zeigt ebenso wie die Calyces die Form einer Ellipse. Die lateral liegenden Strukturen gehören zum OL und dienen der visuellen Informationsaufnahme. Die OL unterscheiden sich beidseitig in Lamina (La), Medulla (Me) und Lobula (Lo), die Schichtenweise auftreten, wobei die Lo mit dem PB verbunden ist. Das Tritocerebrum der Wanze *P. apterus* zeigt eine starke Verschmelzung mit dem USG, welches die Konnektive des Tritocerebrums kreisförmig umschließt und das Gehirn mit den Thorakalganglien (TG) verbindet.



**Abb.5:** 3D Darstellung des Gehirns von *P. apterus* in der Amira Funktion Volren (A) Darstellung des Gehirns von *P. apterus* in anteriorer Sicht (B) Darstellung des Gehirns von *P. apterus* in posteriorer Sicht



**Abb. 6:** Darstellung und Rekonstruktion der verschiedenen Neuropile des Gehirns von *P. apterus* (A-C) 3D Darstellung der Gehirns in *P. apterus* (AL (links: hellgrün, rechts: lila), MB (links: rot, rechts: gelb), La (links: braun, rechts: königsblau), Me (links: pink, rechts: mint), Lo (links: dunkelblau, rechts: apfelgrün), USG (dunkelgrün), protocerebral Loben und Tritocerebrum (graublau), ((A) anteriore Sicht, (B) postiore Sicht (C)-anteriore Sicht ohne die AL),(D-F) Rekonstruktion in Amira des Gehirns von *P. apterus*

Die Volumina, der durch die Rekonstruktion dargestellten Neuropile, wurden im Anschluss berechnet und die für diese Studie wichtigen Neuropile der beiden spiegelsymmetrischen Gehirnseiten zusammengerechnet und der prozentuale Anteil am Gesamtgehirns bestimmt. (Tab.7)

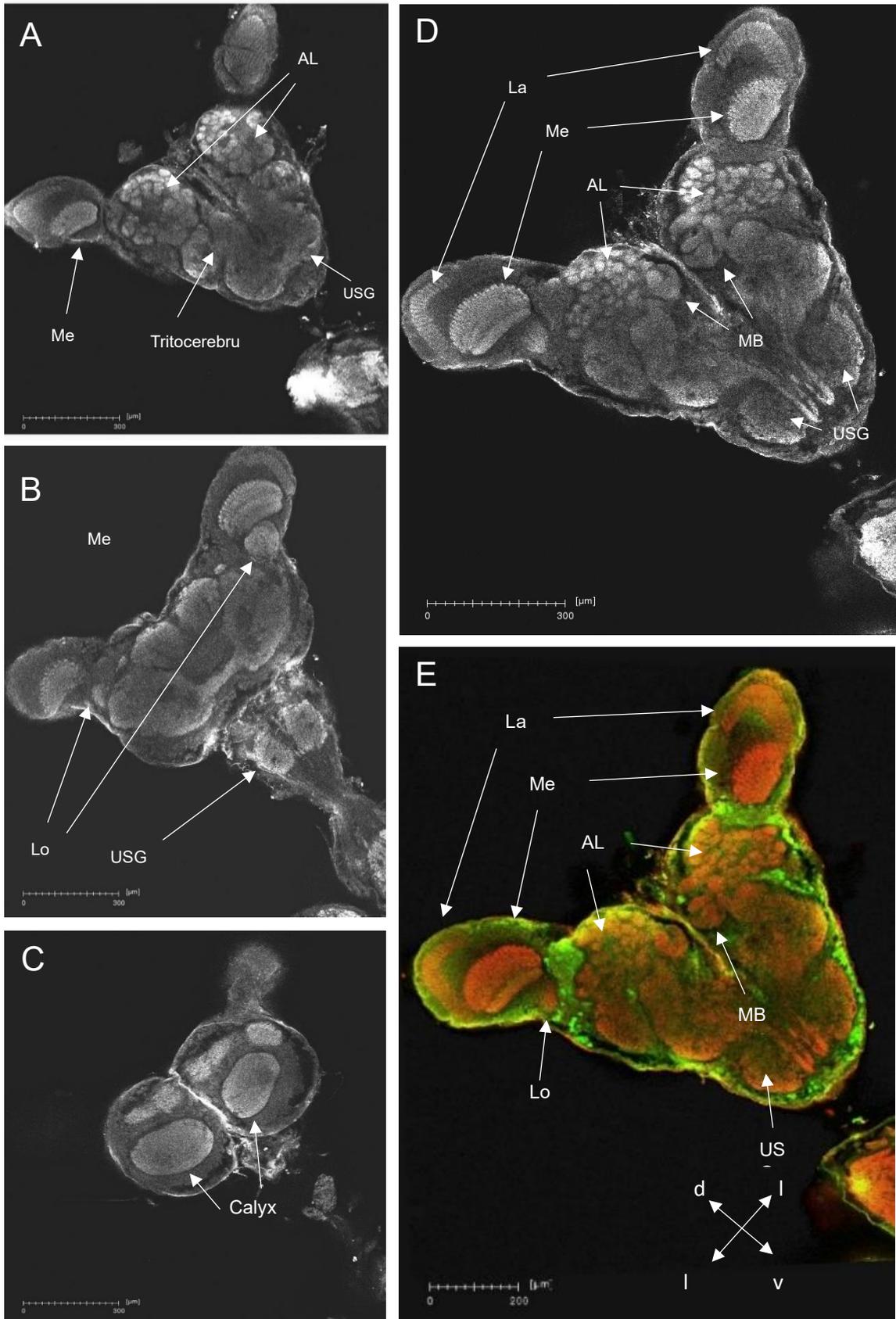
**Tab.7** Volumen und prozentualer Anteil der Neuropile im Gehirn der Landwanze *P. apterus* (bei  $n=2$ , die Neuropile beider Gehirnseiten wurden berechnet und der Durchschnitt aus diesen gebildet)

| Neuropil | Volumen in $10^5 \mu\text{m}^3$ | Prozentualer Anteil am Gehirn in % |
|----------|---------------------------------|------------------------------------|
| AL       | 74,8                            | 14,7                               |
| MB       | 51,7                            | 9,85                               |
| CB       | 6,78                            | 1,29                               |
| PL       | 214                             | 40,76                              |
| La       | 40,7                            | 7,75                               |
| Me       | 45,7                            | 8,07                               |
| Lo       | 13,0                            | 2,48                               |
| GN       | 78,2                            | 14,89                              |
| Gesamt   | 525                             | 100                                |

### 3.3 Färbung des Gehirns mit Synapsin

Abbildung 7 zeigt immunhistologische Färbungen mit Synapsin. Durch diese lassen sich aus der ventralen Ansicht des Gehirns die Neuropile unterscheiden und durch den Vergleich mit anderen Spezies wiedererkennbare Strukturen, sowie die funktionellen Bereiche erkennen. Arthropoden Gehirne unterscheiden sich dabei in artspezifischen Besonderheiten. Je nach Bedeutung der Sinnesorgane zeigen diese eine unterschiedliche Ausprägung von Neurophilen in Größe oder Form. Durch die Färbungen in Abbildung 5 lässt sich der Aufbau der optischen Neuropile nachweisen, diese liegen lateral des Zentralhirns und bestehen aus La, Me und La. Sie dienen der visuellen Aufnahme und Verarbeitung von Informationen und besitzen 18,3% des Gesamtgehirns.

Als Verarbeitungszentren olfaktorischer Signale agieren die AL und die MB. Letztere liegen medial im OSG. Sie fallen durch ihr besonderes Aussehen auf und bestehen aus den Calyces, dem Pedunkulus und den mehrfach gefächerten Loben. Die Loben und Calyces lassen sich durch die Färbung mit Synapsin leicht erkennen, während die Pedukuli durch diese Färbung kaum sichtbar sind.



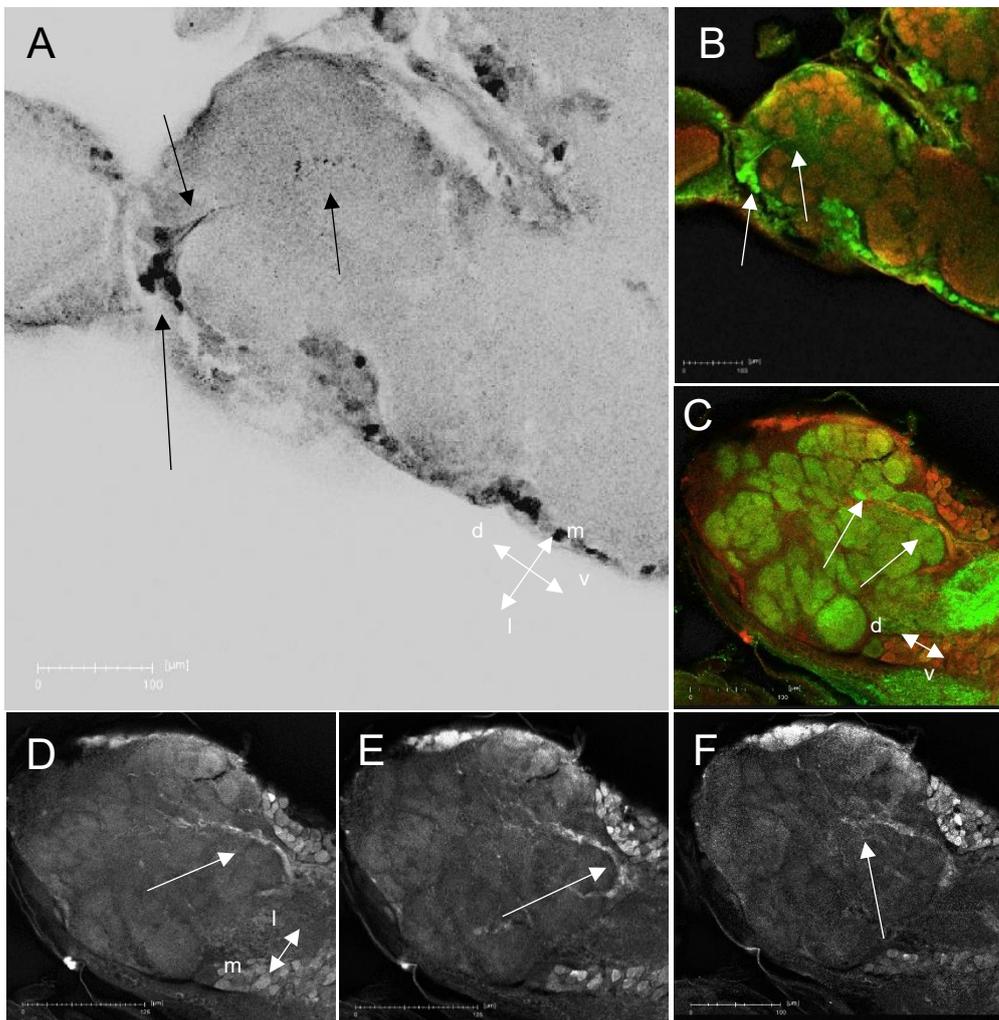
**Abb. 7:** immunhistologische Färbung der Neuropile durch die Antikörper Synapsin und GABA im Gehirn von *P. apterus* (A-D) Aufnahmen der unterschiedlichen Bereiche des Gehirns nach der Färbung durch den Antikörper Synapsin (E) Aufnahmen der immunhistologischen Färbung des Gehirns durch die Antikörper Synapsin (rot) und GABA (grün)

### 3.4 Charakterisierung der olfaktorischen Gehirnareale

#### 3.4.1 Charakterisierung des Antennallobus

##### 3.4.1.1 Charakterisierung des Antennallobus durch den Antikörper GABA

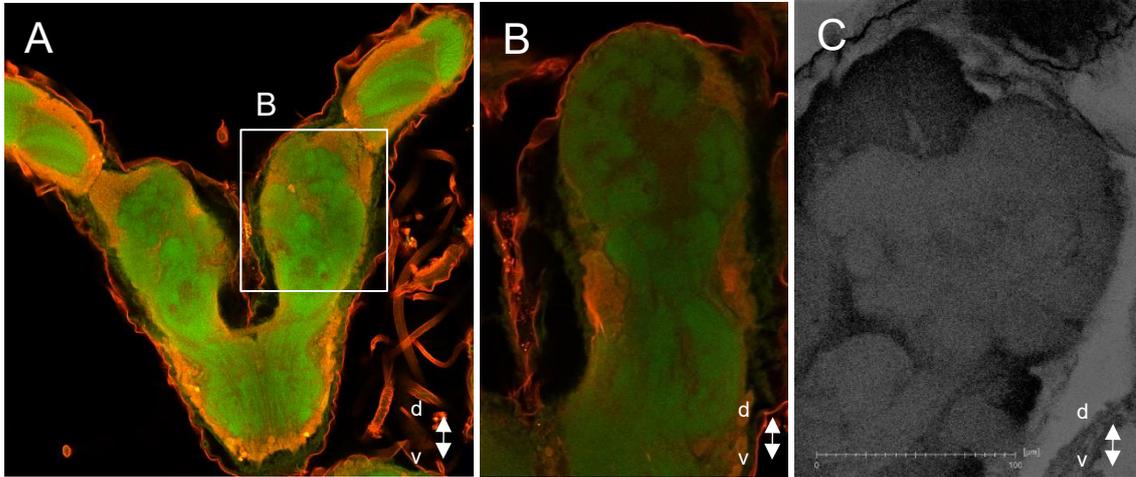
Durch eine immunhistologische Färbung mit dem Antikörper GABA, konnten GABAerge Neurone in bestimmten Bereichen des Gehirns nachgewiesen werden. Die Aufnahmen zeigen die Somata im OSG und USG. Weiterhin konnten Färbungen in dem olfaktorischen Gehirnareal des AL festgestellt werden. Es zeigten sich Axone, die in diesen hineinführen und sich zwischen den Glomeruli verzweigten. Zusätzlich konnten am Rand der äußeren Struktur anliegenden Somata verzeichnet werden. (Abb. 8)



**Abb. 8:** Darstellung von GABAergen Neuronen im AL von *P. apterus* (A) Darstellung des AL in *P. apterus* mit einigen durch den Antikörper GABA angefärbten GABAergen Somata (schwarz) und Neuronen, die sich in den AL ziehen (schwarz) (B) GABAerge Neurone im AL von *P. apterus* angefärbt durch die Antikörper GABA (grün) und Synapsin (rot). (C) immunhistologische Färbungen im AL von *P. apterus* durch die Antikörper GABA (rot) und Synapsin (grün). (D, E, F) immunhistologische Färbungen von GABAergen Neuronen im AL der Wanze *P. apterus*

### 3.4.1.2 Färbungen der Antennallbus mittels Serotonins

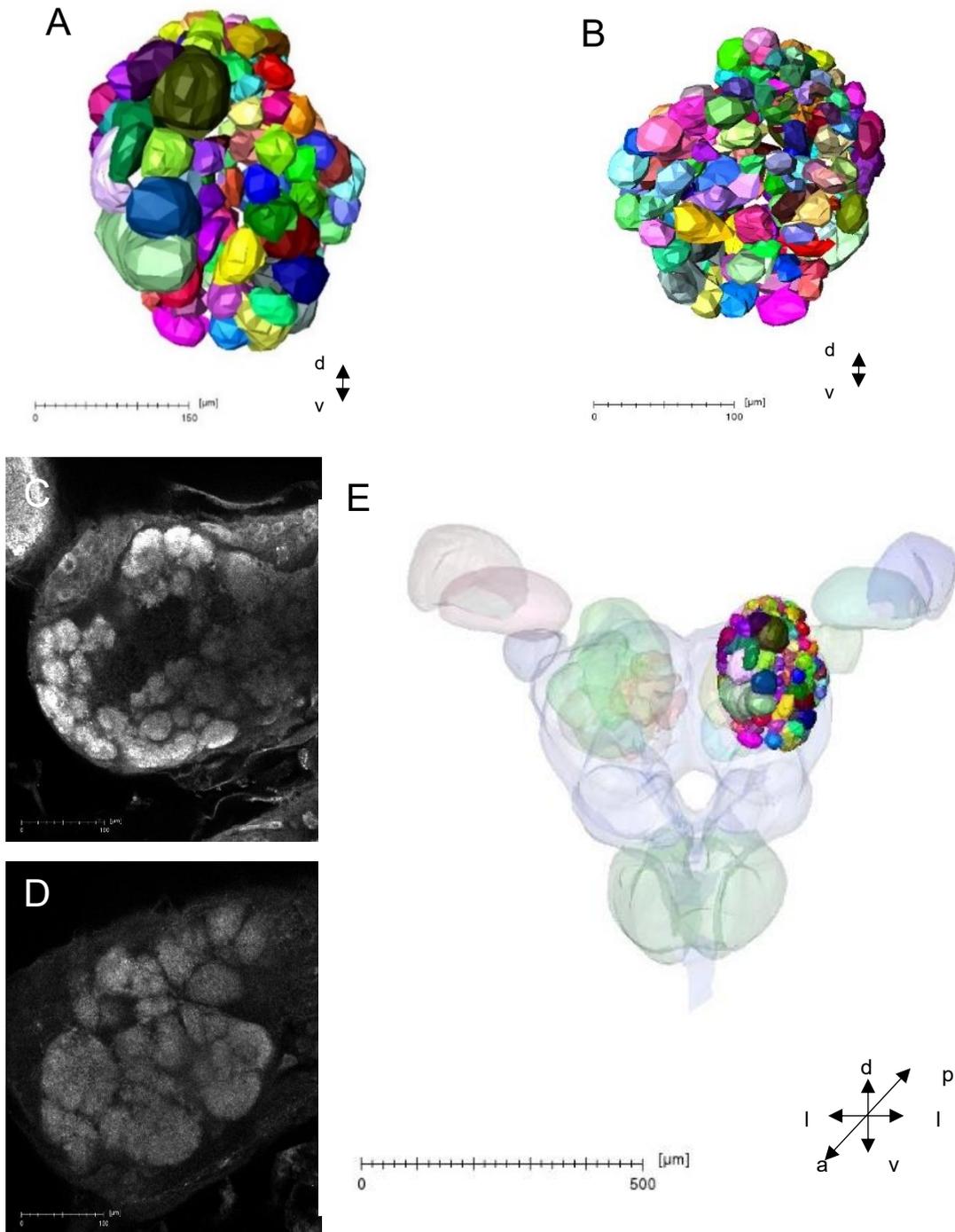
Die Aufnahmen des konfokalen Mikroskops zeigen die Färbung mittels Serotonins, diese lassen keine Färbungen zwischen oder innerhalb der Glomeruli des AL feststellen. Allerdings zeigen sich durch die Färbungen die Somata um den AL und dem gesamten Gehirn. (Abb.9) zeigt weiterhin eine Färbung im Loch des AL.



**Abb. 9:** Darstellung des Gehirns immunhistologisch gefärbt mit Serotonin mit besonderem Merkmal auf dem AL (A) Darstellung des Gehirns mit dem Antikörper Serotonin (rot) (grün ist hier die Autofluoreszenz) (B) Darstellung des AL (C) Darstellung des AL nach der Färbung mit Serotonin

### 3.4.1.3 Glomeruli des Antennallobus

Mit der Software Amira wurden Rekonstruktionen (Abb. 10) erstellt, mit dem Ziel die Struktur des AL und die Anzahl der Glomeruli zu charakterisieren und in Folgeexperimenten die Zielorte der GABAergen Neuronen analysieren zu können. Durch die Rekonstruktion wurden innerhalb des linken AL, dessen Gesamtvolumen eine Größe von  $37,8 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$  aufwies, 135 Glomeruli gezählt werden, die sich auf ein Volumen von  $25,2 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$  verteilen. (Abb. 10)

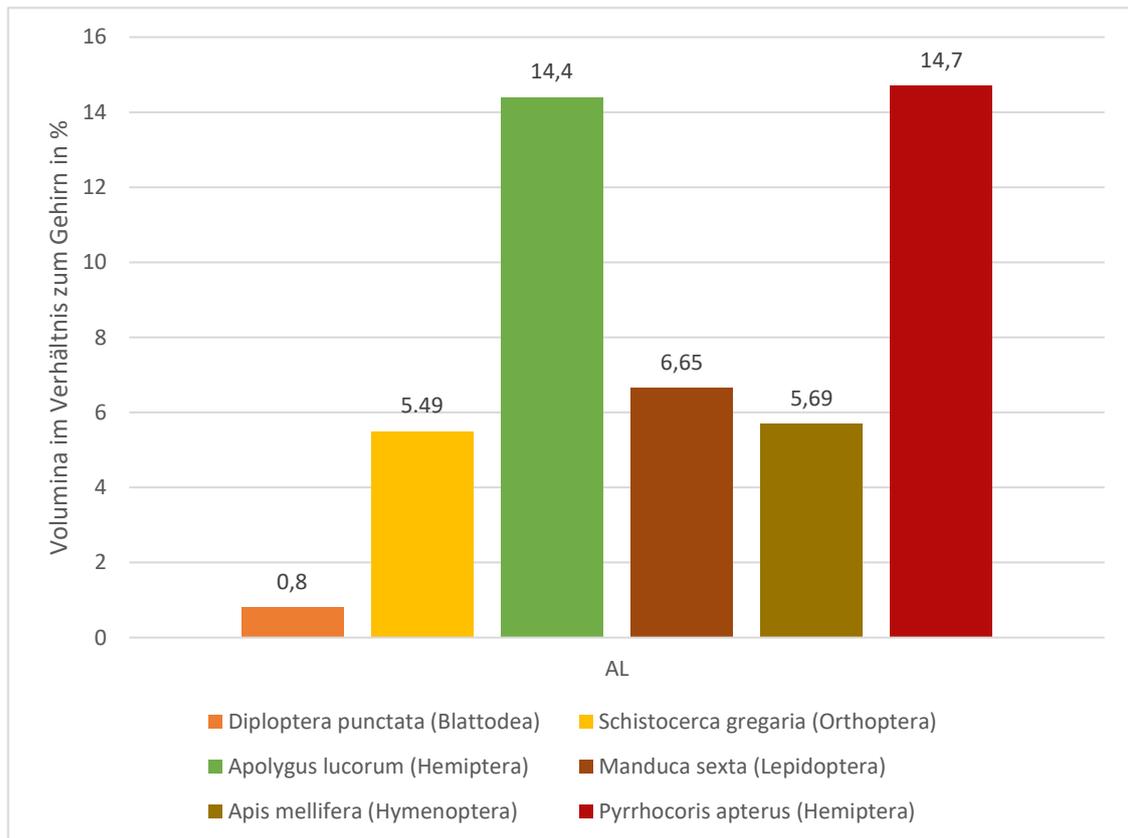


**Abb.10:** Darstellung und Rekonstruktion der Glomeruli im AL von *P. apterus* (A) Rekonstruktion der Glomeruli im AL aus dorsaler Sicht (B) Rekonstruktion der Glomeruli im AL aus ventraler Sicht (C,D) Darstellung der Glomeruli im AL (E) Dorsale Sicht auf das Gehirn besonderes Merkmal auf den Glomeruli

Die Differenz zwischen den Gesamtvolumina und den der Glomeruli begründet sich durch Zwischenräume, wie Nervenzellfortsätze und neuronale Trakte, die innerhalb der Gehirnstruktur auftreten.

### 3.4.1.5 Vergleich zu anderen Spezien

Im Vergleich zu anderen Insekten (Abb.11) lässt sich erkennen, dass die AL von *P. apterus* einen großen Anteil des Gesamtgehirns beträgt. Bei der Wanze lässt sich ein Anteil von 14.7% des Gesamtgehirns erkennen. (Abb.11)

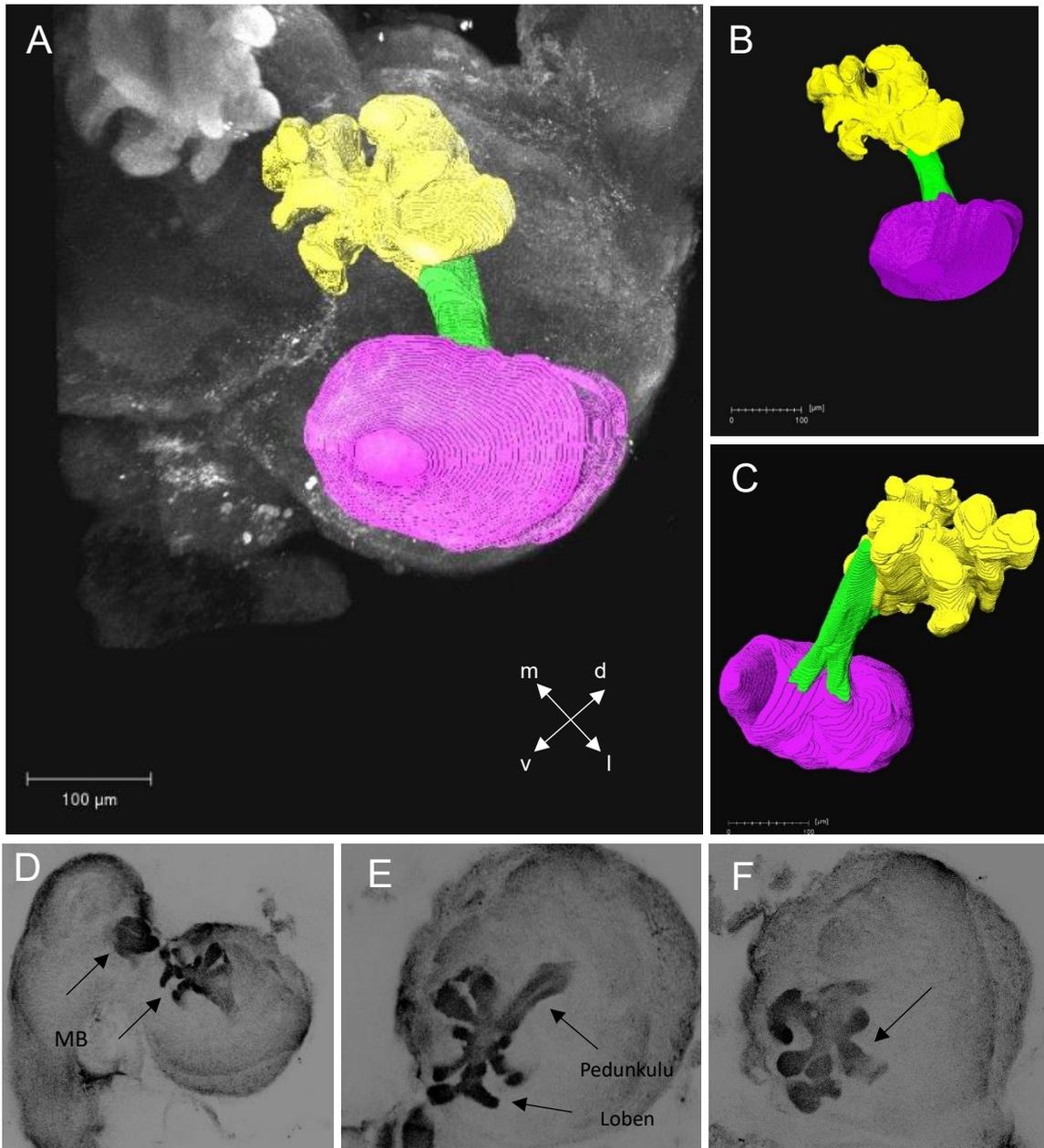


**Abb. 11:** Volumina der AL verschiedener Insekten im Verhältnis zum Gesamtgehirn in % (in Anlehnung an Xie, G. Y., Ma, B. W., Liu, X. L., Chang, Y. J., Chen, W. B., Li, G. P., Feng, H. Q., Zhang, Y. J., Berg, B. G., & Zhao, X. C. (2019). Brain organization of apolygus lucorum: A hemipteran species with prominent antennal lobes. *Frontiers in Neuroanatomy*, 13.)

### 3.4.2 Charakterisierung des Pilzkörpers

#### 3.4.2.1 Rekonstruktion des Pilzkörpers

Die MB ist in Insekten ein olfaktorisches Neuropil und beinhaltet ein hohes Volumen an Neuronen des gesamten Gehirns (Tab.7). Diese konnten zum Teil mit dem immunhistologischen Antikörper Synapsin angefärbt werden, mithilfe einer Rekonstruktion ließen sich die MB darstellen. (Abb. 10)



**Abb. 12:** Darstellung und Rekonstruktion des MB der Wanze *P. apterus* durch immunhistologische Färbung mit dem Antikörper R8E6 (A) Rekonstruktion des MB im Gehirn (B,C) 3D Rekonstruktion des Pilzkörpers (D-F) Darstellung des MB durch die immunhistologische Färbung mit dem Antikörper R8E6

Dabei fiel auf, dass durch den Antikörper keine genauen Grenzen der Loben sichtbar gemacht werden konnten. Um diese darzustellen, wurde der Antikörper R8E6 eingesetzt, Grund dafür ist die spezifische und kontrastreiche Färbung der MB. Die Rekonstruktion auf Grundlage der Proteinkinase zeigt den MB des linken AL (Abb.10). Die Landwanze *P. apterus* zeigt einen Calyx, um welchen die Somata versammelt sind und einen doppelten Aufbau besitzt, der durch zwei hervortretende Höcker auffällt. Dieser erscheint zusammengewachsen. An den Calyx angebunden erscheint der Pedunkulus. Dieser besteht aus zwei zusammengewachsenen Strängen, die sich vor dem Calyx trennen. Die Loben bestehen aus acht Fingern die sich ausgehend vom Pedunkulus in verschiedene Richtungen und Tiefen erstrecken. (Abb. 12)

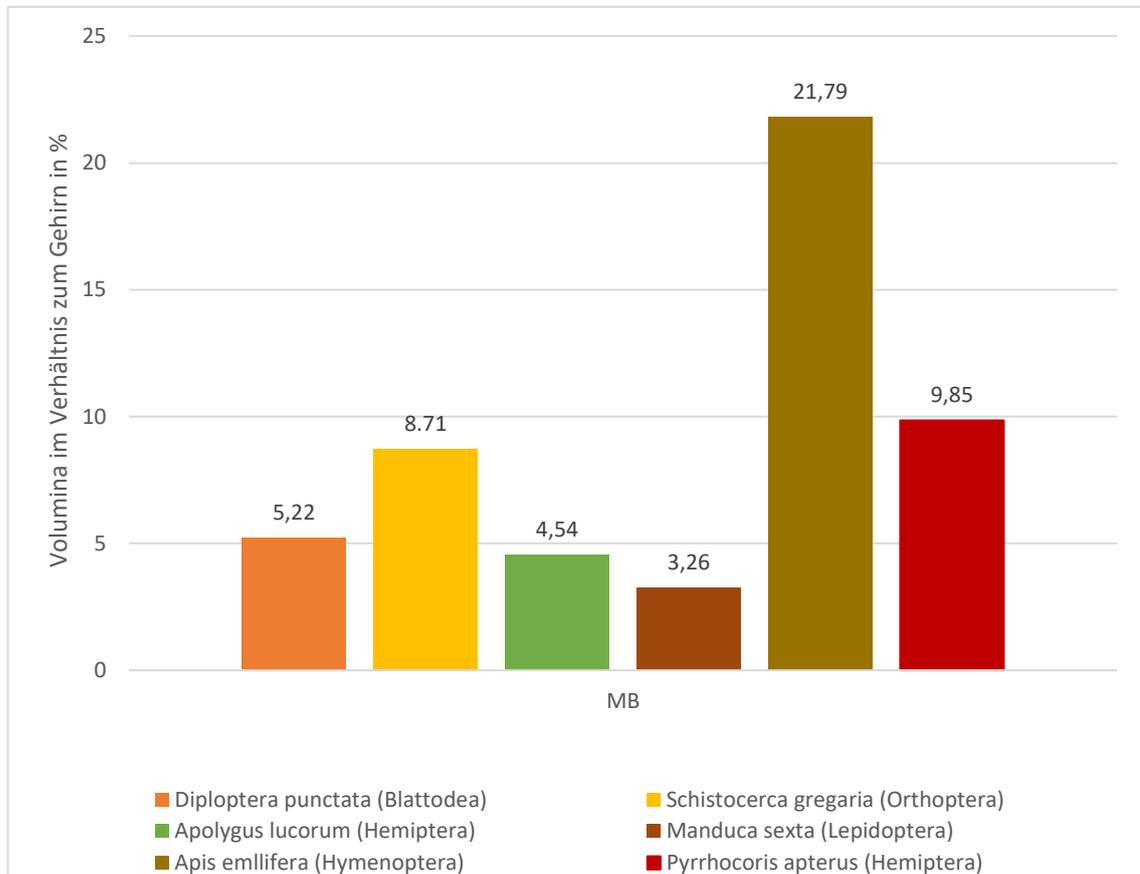
Die Größe eines MB beträgt  $29,6 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ , welches ca. 5% des Gesamtgehirns entsprechen. Dabei nimmt der Calyx den größten Anteil mit 56,42% ein. Die Loben entsprechen einem Betrag von 38,5%, während der Pedunkulus 4,83% des MBs ausmacht. (Tab. 8)

**Tab.8:** Volumen und prozentualer Anteil der Pilzkörperbestandteile im Verhältnis zum gesamten Neuropil des Pilzkörpers (bei n=1, Neuropil einer Seite)

| Pilzkörperareal | Volumen in $10^5 \mu\text{m}^3$ | Anteil am MB in % |
|-----------------|---------------------------------|-------------------|
| Calyx           | 16,7                            | 56.42%            |
| Pedunkulus      | 1,43                            | 4.83%             |
| Loben           | 11,4                            | 38.5%             |
| Gesamt          | 29,6                            | 100               |

### 3.4.2.2 Vergleich des Pilzkörpers mit anderen Spezies

Die MB der Insekten zeigen verschiedene Volumina im Verhältnis zu ihrem Gesamtgehirn. *P. apterus* zeigt mit einem Anteil von 9.85% den zweitgrößten Anteil des MBs im Gehirn der hier verglichenen Arten. (Abb. 13)



**Abb. 13:** Volumina der MB verschiedener Insekten im Verhältnis zum Gesamtgehirn ((in Anlehnung an Xie, G. Y., Ma, B. W., Liu, X. L., Chang, Y. J., Chen, W. B., Li, G. P., Feng, H. Q., Zhang, Y. J., Berg, B. G., & Zhao, X. C. (2019). Brain organization of apolygus lucorum: A hemipteran species with prominent antennal lobes. *Frontiers in Neuroanatomy*, 13.)

## 4. Diskussion

### 4.1 Lage des Gehirns

Bei vielen Insekten liegt das Gehirn zentralisiert im Kopfsegment des Tieres. [40] und folgt der Ausrichtung des Kopfes. Bei einigen Hemipteren lassen sich Verwachsungen von OSG und USG feststellen, die mittig vom Ösophagus durchzogen werden. [21] Begründen lässt sich dies durch die Zentralisierung des Gehirns (Cephalisation). Die Zentralisierung sorgt durch Zusammenlagerung der Strukturen für eine verbesserte Verarbeitung und konzentriert die Funktionen im Kopfsegment. [21] Zugehörig zum Nervensystem sind zusätzlich die im Thorax und Abdomen vorliegenden Ganglien. [12] Die Verschmelzung dieser lassen auf eine Anpassung des Gehirns schließen, die sich aufgrund der artspezifischen Lebensbedingungen eingestellt hat. Untersuchungen ergaben einen Unterschied der Verwachsung der Ganglien in Larven und adulten Tieren. In adulten Insekten unterscheidet sich die Verwachsungen der Ganglien. In *Acridiaen* lassen sich wenig Verwachsungen feststellen, diese finden sich in der Verschmelzung der Pro-, Meso- und Metathorakalganglien und im Bereich der Abdominalganglien (AG). In einigen Wanzen, wie den *Pentatomidaen*, lassen sich vollständige Verwachsungen aller Ganglien feststellen. [21] Derzeit findet sich noch keine Begründung für die Zusammenlagerung der Ganglien im Thorax und Abdomen, allerdings finden sich diese vor allem in höheren Gruppen des Stammbaums. In der Landwanze *Pyrrhocoris apterus* (*P. apterus*) lässt sich das Gehirn im Kopfsegment des Tieres feststellen, welches Verwachsungen des OSG und USG aufzeigt. Weiterhin zeigen die Ergebnisse Verwachsungen der Pro-, Meso- und Metathorakalganglien und eine weitere Verwachsung der AGs zu einem Thorakal (TG)- und einem AG in der Wanze *P. apterus* erkennen.

### 4.2 Aufbau des Gehirns

Das Insektengehirn besteht aus drei Neuomere, die unterschiedliche Volumenanteile im Gehirn einnehmen. In der Honigbiene *Apis mellifera* nimmt der Pilzkörper (MB) des Protocerebrum eine besondere Größe ein, während die Heuschrecke *Locusta migratoria* auffällig große optische Loben (OL) besitzt. In einigen Insekten findet sich eine Verschmelzung des OSG und USG, diese sind vor allem polyphyletisch und in höheren Gruppen des Stammbaums festzustellen. [21] Weiterhin lässt sich vermuten, dass die Verschmelzung mit der Größe des Insektes zusammenhängt. Um die gleiche Komplexität, wie Tiere mit einem größeren Nervensystem zu erlangen verschmelzen die Neuomere miteinander und sorgen damit für eine Zentralisierung der Verarbeitung von Informationen. Diese Verschmelzung sorgt weiterhin für eine schnellere Übertragung der Signale, da lange Übertragungswege vermieden werden. Damit kann das Insekt schneller auf Umwelteindrücke reagieren.

Der Aufbau des Gehirns von *P. apterus* zeigt den klassischen Aufbau eines Insektengehirns in Protocerebrum (PB), Deutocerebrum und Tritocerebrum, sowie das USG und die im Körper des Tieres vorliegenden Ganglien. Dabei zeigt sich, wie bei anderen Hemipteren eine Verschmelzung des OSG und USG.

Die Größe des Gehirns von *P. apterus* ist im Verhältnis ähnlich wie in anderen Insekten, auffällig sind die olfaktorischen Neuropile, die einen großen Anteil am Gesamtgehirn besitzen. [38]

Es wird vermutet, dass Insekten mit auffällig großen Antennen meist große olfaktorische Gehirnareale besitzen, dies lässt sich am Beispiel der Honigbiene aufzeigen. [41] Die Größe des AL ist jedoch auch von weiteren Faktoren abhängig, wie der Größe der Glomeruli, bzw. dem olfaktorischen System und den zwischen ihnen verlaufenden Trakten.

In der Landwanze *P. apterus* lassen sich große Antennen und ein großen AL feststellen. Der Zusammenhang zwischen der Größe der Antennen und dem AL müsste in folgenden Studien weiter erforscht werden.

### **4.3 Olfaktion in *Pyrrhocoris apterus***

Olfaktion spielt in Insekten eine wichtige Rolle, diese dient der Wahrnehmung von Feinden, möglichen Sexualpartner, Futtersuche und dient dem Überleben der Art. [42] Die Geruchswahrnehmung beginnt an den Sensillen, diese empfangen die Geruchsmoleküle und senden durch diese ausgelöst, Signale an olfaktorische Neuropile weiter, die diese verarbeiten. [43]

Als primäres olfaktorisches Neuropil beinhaltet der AL viele runde Strukturen die Glomeruli genannt werden. In Insekten unterscheidet sich der Aufbau des AL aufgrund artspezifischer Unterschiede der Geruchsverarbeitung in Form und Größe. [47]. Im Vergleich zu anderen Insekten lässt sich erkennen, dass Insekten der Ordnungen Orthoptera, Hymenoptera und Lepidoptera einen AL zeigen, welcher einen Anteil von ca. 5% einnimmt, während die AL der Hemipteren einen großen Anteil des Gesamtgehirns betragen. Dies bestätigt sich in der Wanze *P. apterus* in welcher der AL einen großen Anteil des Gehirns einnimmt.

Die Glomeruli lagern sich bei vielen Insekten in mehreren Schichten um ein Nervenbündel herum. [44] Bei einigen Arten, wie in der amerikanische Rebzikade *Scaphioideus titanus* ließen sich keine Glomeruli im AL nachweisen, wohingegen bei der Heuschrecke, *Locusta migratoria* bis zu 1000 Glomeruli nachgewiesen werden konnte. [45] Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zeigt 62 Glomeruli, die sich als Zusammenlagerung um ein Nervenbündel verteilen. [46] Es wird vermutet, dass Tiere mit hoher Anzahl an Glomeruli viele Geruchsmoleküle unterscheiden können, da ihre Anzahl mit der Anzahl der Duftstoffrezeptoren korreliert. [26]. In der Ordnung der wasserlebenden Insekten zeigt sich die Bestätigung dessen. Das Wasserinsekt *Notonecta glauca* zeigt nur 30 Glomeruli, die sich im AL befinden, welcher 2% des Gesamtgehirns einnimmt. Es wird vermutet, dass aufgrund der Anpassung an Umweltbedingungen, wasserlebenden Insekten kaum noch einen Geruchssinn benötigen, viel mehr verwenden diese Tiere ihr optisches System, um sich auch unter Wasser zurechtzufinden. [56] Die Wanze *P. apterus* zeigt eine gute Riechleitung durch eine hohe Glomeruli Anzahl von 135 pro Seite, welche in der Ordnung der landlebenden Hemipteren zu erwarten ist.

Glomeruli interagieren im AL über lokale Interneurone, womit sie die Signale transformieren. Diese werden anschließend auf Projektionsneurone (PN) übertragen, die die Signale in höhere Verarbeitungszentren weiterleiten. [48, 26] Die Verschaltung über lokale Interneurone im AL konnte in dem Organismus *P. apterus* vorgefunden werden, in Form der mit GABA markierten Neurone. (Abb. 8) Allerdings ließen sich keine PN finden, hierzu müssen in Zukunft weitere Studien durchgeführt werden.

Neurotransmitter sind wichtige Botenstoffe im Gehirn, sie sorgen für die Übertragung und Weiterleitung der Signale in den Neuronen. Als Haupttransmitter der lokalen Interneurone wurden in einigen Insekten, wie der Motte *Manduca sexta*, der Neurotransmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) festgestellt [44]. Neue Studien zeigen ebenfalls die Nachweise cholinergischer Interneurone in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. [26] In der Honigbiene *Apis mellifera* und Heuschrecken der Art *Locusta migratoria* wurde der Neurotransmitter GABA ebenfalls in bestimmten PN vorgefunden. [44]. Diese Studie zeigt, dass sich auch in der Landwanze *P. apterus* GABAerge Neuronen im AL befinden, dies lässt vermuten dass diese eine wichtige Funktion übernehmen und der Kommunikation zwischen den Glomeruli dienen. Der Neurotransmitter GABA wurde in PN der Landwanze *P. apterus* nicht weiter untersucht, es konnten allerdings weitere Färbungen im Gehirn vorgefunden werden.

Als weiterer Neurotransmitter wurde Serotonin im primären olfaktorischen Zentrum der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* nachgewiesen. Dieser konnten anhand von Färbungen innerhalb der Somata um den AL von *P. apterus* in dieser Studie nachgewiesen werden. [49]

Die MB in Insekten gelten als das Verarbeitungszentrum sensorischer Informationen. Durch PN erhalten sie Signale von den Glomeruli der AL. [50] Die MB bestehen aus Calyx, Pedunkulus und den Loben, die mehrfach gefächert sind. Die Größe und Form dessen ist artumgreifend unterschiedlich. [51] Der Calyx der Hymenoptera besitzt die Form einer Schale, indem die Somata der Kenyon Zellen enthalten sind. Bei andere Insektenarten sammeln sich die Somata um den Calyx herum. [16]. Dabei gibt es Unterschiede in der Form des Calyx, dieser kann als einfache oder doppelte becherartige Struktur vorliegen. Ein Calyx mit doppeltem aber getrennt vorkommenden Aufbau findet sich schon früh in Insekten, wie den Honigbienen oder den Ameisen, diese verschmelzen in den Tieren zu einem Pedunkulus über welchen die Informationen an die Loben weitergeleitet werden. [16] In Heuschrecken und Käfern lässt sich ein Calyx mit einfachem Aufbau finden, wohingegen man bei einigen Hemipteren wie *Apolygus lucorum* einen doppelten Aufbau findet, der zusammengewachsen zu sein scheint und in einen Pedunkulus mündet. [38] Dieser dient der Weiterleitung von Informationen. Er besteht aus den Axonen der Kenyon Zellen und besteht aus verschiedenen Anzahlen an Strängen, wie bei der Biene [52] Heuschrecke oder Wanzenarten. [38] Er setzt sich aus den Axonen und vereinzelt Eingängen für sensorische Informationen zusammen. Die Loben unterscheiden sich in ihrem Aufbau zwischen den Arten, in der Anzahl und der Form dieser. [53] Die MB der Insekten zeigen einen unterschiedlichen Aufbau sowie verschiedene Volumina im Verhältnis zu ihrem Gesamtgehirn die Ursache der artspezifischen Unterschiede sind. Bei der Honigbiene *Apis mellifera* hat der MB, der sich in zwei Loben fächert, einen Anteil 21.79% den größten Anteil am Gehirn vergleichenden Arten. Andere Arten der Hemipteren besitzen dabei deutlich geringere Anteile, wie *Apolygus lucorum*. Der MB von *P. apterus* fächert sich in acht Loben und zeigt mit einem Anteil von 9.85% den zweitgrößten Volumenanteil des MB im Gehirn der Insekten, die von mir verglichen wurden. (Abb. 13)

Aufgabe des MBs ist die Verarbeitung multipler sensorischer Informationen, wozu auch olfaktorische Signale zählen. Das Fehlen oder durch eine Zerstörung dessen in einigen Insekten, wie der Heuschrecke, Grillen und Bienen hat zur Erkenntnis geführt, dass diese Tiere zwar lebensfähig waren, aber einige Verhaltensauffälligkeiten zeigten. [54]

Neben dem Fehlen der Lernfähigkeit für Gerüche zeigten sich noch andere Unterschiede zu Tieren die einen MB besitzen. [16] Weitere Studien ergaben, dass einige Insekten, wie die Wasserwanzen Heteroptera die aufgrund ihrer ökologischen Nische keinen Geruchssinn benötigen, trotzdem einen MB besitzen. Anders als in vorher beschriebenen Insekten bestehen diese jedoch nur aus den Loben und dem Pedunkulus. Die Anwesenheit des MB bestätigt die Theorie, dass dieser nicht ausschließlich für die Verarbeitung von olfaktorischen Signalen verantwortlich ist, sondern auch andere Funktionen bedient [55,56]

Vermutungen gingen davon aus, dass die Größe des MBs Einfluss auf die Intelligenz der Tiere haben musste. Aufgrund dessen wurden Bienen lange Zeit für die intelligentesten Insekten gehalten. [57] Diese These konnte bisher weder bestätigt oder noch widerlegt werden, allerdings wird davon ausgegangen, dass der MB für das Lernen verantwortlich ist und damit eine entscheidende Rolle in der Intelligenzbildung spielt. Aufgrund des Verhaltens von den sozialen Bienen, wird davon ausgegangen, dass dieses ihrem großen MB zugrunde liegt. [57,58] Die Wanze *P. apterus* zeigt ebenfalls einen großen MB im Verhältnis zum Gesamtgehirn. Auch zeigt diese viele Verhaltensweisen, die auf eine soziale Lebensweise hinweisen, wie die Zusammenlagerung der Tiere zu großen Aggregationen. Deshalb lässt sich vermuten, dass das Verhalten des Insektes durch die Verarbeitung der sensorischen Informationen des großen MB begründet ist.

Die Olfaktion in Insekten spielt sich hauptsächlich im AL und dem MB ab. Der AL zählt dabei als primäres olfaktorisches Zentrum, welches durch Interneurone die Signale innerhalb dessen weiterleitet und anschließend durch PN in den MB als Verarbeitungszentrum weiterleitet. [43] Studien der Motte *Manduca sexta* vermuten zusätzlich eine integrative Verarbeitung der Gerüche im AL, dies lässt sich zurzeit noch nicht bestätigen. [44] Die Wanze zeigt beide olfaktorischen Zentren auf, die einen großen Anteil im Gehirn einnehmen, diese Anatomie entspricht einem olfaktorisch geprägten Tier, um diese Annahme zu bestätigen müssen weitere Experimente durchgeführt werden.

#### **4.4 Ausblick**

Durch diese Studie wurden erste Einblicke in das Nervensystem der Landwanze *P. apterus* hervorgebracht, die durch weitere Studien bestätigt und ergänzt werden müssen. Dabei ergeben sich verschiedene Ansätze mit dem Ziel das Verarbeitungszentrum der Wanze besser verstehen zu können. Um diese Studie zu ergänzen, können durch weitere immunhistologische Verfahren Zielorte und Verbindungen der Neurotransmitter und deren Wirkorte dargestellt werden. Für Erkenntnisse über die Olfaktion und deren Verbindungen in weitere Gehirnbereiche ergibt sich die Möglichkeit die Neuronen mittels Elektrophysiologischer Versuche weitere Daten zu erlangen. Ebenfalls dienen Nachweise wie die retrograde Füllung als Methode über die Aufklärung des Weges der Signale. Das Versuchstier *P. apterus* bietet viele Möglichkeiten der Erforschung, die in anschließenden Studien verfolgt werden sollten.

## 5. Zusammenfassung

Diese Studie beschäftigt sich mit der Gehirnorganisation und der Olfaktion in *Pyrrhocoris apterus* (*P. apterus*). Um die Gehirnorganisation zu erfassen, wurde ein Computertomographie (CT) von Kopfbereich des Insekts gemacht und dieses anschließend durch eine Rekonstruktion dreidimensional dargestellt. Dieses Verfahren ließ einen Überblick über die Lage im Körper und die Größe erlangen. Anschließend wurden die Neuropile in der Wanze rekonstruiert, dabei galt besonderes Merkmal den olfaktorischen Neuropilen. Um diese darzustellen, wurde das Gehirn mit den dort vermuteten Antikörpern,  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und Synapsin behandelt, dies zeigte sich erfolgreich im Bereich der lokalen Interneurone. Im Vergleich zu anderen Insekten zeigte sich der Antennallobus (AL) auffallend groß. Diese Erkenntnis ließ sich allerdings auch bei anderen Wanzen vorfinden. Der AL beinhaltet 135 Glomeruli, was sich im Vergleich der Hemipteren in den Durchschnitt einordnet. Ebenfalls verhältnismäßig groß zeigte sich der Pilzkörper (MB) in *P. apterus*. Dieser wurde mittels immunhistologischer Färbung mit Synapsin dargestellt und anschließend nach der Behandlung mit der Proteinkinase R8E6 abgebildet. Die Proteinkinase konnte die Loben des MB deutlich darstellen, was sehr hilfreich für die Rekonstruktion und anschließender Volumeneinordnung war. Im Vergleich zu anderen Insekten zeigte sich, dass nur bei Bienen (in diesem Vergleich Abb. 13) der MB einen größeren Anteil am Gesamtgehirn einnimmt. Diese Erkenntnis stärkt die Annahme, dass durch die sozialen Kontakte zwischen den Insekten das Verarbeitungszentrum entwickelt und gestärkt wird. All diese genutzten Methoden zeigten einen Einblick in das Thema Gehirnorganisation und immunhistologische Charakterisierung der olfaktorischen Gehirnareale in der Landwanze *P. apterus*. Für tiefere Einblicke werden Studien in kommenden Jahren sorgen.

## **Danksagung**

Diese Forschungsarbeit wurde im Rahmen eines Bachelorstudiums der Ernst-Abbe-Hochschule angefertigt, diese Arbeit wurde im Max-Planck-Institut für chemische Ökologie in Jena durchgeführt. Bei dieser Arbeit wurde ich von der Projektgruppe Neuronale Schaltkreise in allen Bereichen unterstützt, besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Jürgen Rybak welcher mich jederzeit sachkundig unterschützte, sowie den Mitarbeitenden Eleftherios Dimitriou und Ngoc Ahn Luu. Für die CT-Aufnahmen danke ich vielmals Benjamin Weiss. Weiterhin möchte ich mich bei Roland Spiess bedanken, der mich beim Schreiben der Arbeit unterschützt und jederzeit ermutigt hat. Auch bei allen weiteren Mitarbeitenden des Max-Planck-Instituts für chemische Ökologie möchte ich mich für die angenehme und immer hilfsbereite Arbeitsatmosphäre bedanken. Von Seiten der Hochschule gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Antje Burse, die mir jederzeit bei Fragen beiseite stand.

## Quellenangaben

- [1] *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera) sbd an experimental model species: A review. (n.d.). Retrieved July 2, 2023, from <https://eurekamag.com/research/009/281/009281975.php>
- [2] Endrestøl, A., & Roth, S. (n.d.). The firebug *Pyrrhocoris apterus* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera, Heteroptera) new to the Norwegian fauna-with an explosive expansion in Northern Europe.
- [3] Enikógyuris, E., Feró, O., Tartally, A. S., & Barta, Z. N. (n.d.). Individual behaviour in firebugs (*Pyrrhocoris apterus*). <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1326>
- [4] Bohlin, T., Gamberale-Stille, G., Merilaita, S., Exnerová, A., Štys, P., & Tullberg, B. S. (2012). The detectability of the colour pattern in the aposematic firebug, *Pyrrhocoris apterus*: an image-based experiment with human “predators.” <https://academic.oup.com/biolinnean/article/105/4/806/2452440>
- [5] Socha, R., & Zemek, R. (2010). Wing morph-related differences in the pattern of mating activity in a flightless bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/07924259.2004.9652600](http://Dx.Doi.Org/10.1080/07924259.2004.9652600), 46(1), 11–18. <https://doi.org/10.1080/07924259.2004.9652600>
- [6] *Pyrrhocoris apterus* - Gemeine Feuerwanze - arthropodafotos.de. (n.d.). Retrieved August 17, 2023, from [https://arthropodafotos.de/dbsp.php?lang=deu&sc=0&ta=t\\_42\\_hem\\_het\\_pyr&sci=Pyrrhocoris&scisp=apterus](https://arthropodafotos.de/dbsp.php?lang=deu&sc=0&ta=t_42_hem_het_pyr&sci=Pyrrhocoris&scisp=apterus)
- [7] Buschbeck, E. K., & Strausfeld, N. J. (1997). The Relevance of Neural Architecture to Visual Performance: Phylogenetic Conservation and Variation in Dipteran Visual Systems Indexing terms: evolution of visual systems; uniquely identifiable neurons; motion detection; fly visual behavior. *J. Comp. Neurol*, 383, 282–304.
- [8] Strausfeld, N. J. (n.d.). Brain organization and the origin of insects: an assessment. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1471>
- [9] Lichtneckert, R., & Reichert, H. (2005). Insights into the urbilaterian brain: conserved genetic patterning mechanisms in insect and vertebrate brain development. *Heredity* 2005 94:5, 94(5), 465–477. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800664>
- [10] Strausfeld, N. J., Hou, X., Sayre, M. E., & Hirth, F. (n.d.). The lower Cambrian lobopodian *Cardiodictyon* resolves the origin of euarthropod brains. Retrieved May 19, 2023, from <https://www.science.org>
- [11] Farris, S. M. (n.d.). Insect societies and the social brain. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.01.010>
- [12] Ito, K., Shinomiya, K., Ito, M., Armstrong, J. D., Boyan, G., Hartenstein, V., Harzsch, S., Heisenberg, M., Homberg, U., Jenett, A., Keshishian, H., Restifo, L. L., Rössler, W., Simpson, J. H., Strausfeld, N. J., Strauss, R., & Vosshall, L. B. (2014). A systematic nomenclature for the insect brain. *Neuron*, 81(4), 755–765. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.017>
- [13] Royan, G., Williams, L., & Meier, T. (1993). Organization of the Commissural Fibers in the Adult Brain of the Locust. *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY*, 332, 358–377. <https://doi.org/10.1002/cne.903320308>
- [14] Nassif, C., Noveen, A., & Hartenstein, V. (1998). Embryonic development of the *Drosophila* brain. I. Pattern of pioneer tracts. *Journal of Comparative Neurology*, 402(1), 10–31. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19981207\)402:1<10::AID-CNE2>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19981207)402:1<10::AID-CNE2>3.0.CO;2-5)
- [15] Homberg, U. (2004). In search of the sky compass in the insect brain. *Naturwissenschaften*, 91(5), 199–208. <https://doi.org/10.1007/S00114-004-0525-9/FIGURES/5>
- [16] Fahrbach, S. E. (2006). STRUCTURE OF THE MUSHROOM BODIES OF THE INSECT BRAIN. *Annu. Rev. Entomol*, 51, 209–241. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.150954>

- [17] Boyan, G. S., & Reichert, H. (2011). Mechanisms for complexity in the brain: Generating the insect central complex. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 34, Issue 5, pp. 247–257). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.02.002>
- [18] Pfeiffer, K., & Homberg, U. (2014). Organization and functional roles of the central complex in the insect brain. *Annual Review of Entomology*, 59, 165–184. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162031>
- [19] Homberg, U., Christensen, T. A., & Hilde, J. G. (1989). STRUCTURE AND FUNCTION OF THE DEUTOCEREBRUM IN INSECTS 1 Further ANNUAL REVIEWS. [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
- [20] Antoni, S., & Homberg, U. (n.d.). Antennal Lobe Structure.
- [21] Milde, J. (2010). Nervensystem. *Lehrbuch Der Entomologie*, 205–227. [https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2618-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2618-5_8)
- [22] Loudon, C. (2009). Antennae. *Encyclopedia of Insects*, 21–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00006-0>
- [23] Ren, D., Gao, T., Shih, C., Labandeira, C. C., Santiago-Blay, J. A., & Yao, Y. (n.d.). Convergent evolution of ramified antennae in insect lineages from the Early Cretaceous of Northeastern China. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1448>
- [24] Callahan, P. S. (1975). INSECT ANTENNAE WITH SPECIAL REFERENCE TO THE MECHANISM OF SCENT DETECTION AND THE EVOLUTION OF THE SENSILLA\*. In *J. Insect Morphol. & Embryol* (Vol. 4, Issue 5). Pergamon Press.
- [25] Eikel, O. (n.d.). Evolution der Sensillen und deren Verteilung an den Mundwerkzeugen der Insekten - Georg-August-Universität Göttingen. Retrieved August 17, 2023, from <https://www.uni-goettingen.de/de/evolution+der+sensillen+und+deren+verteilung+an+den+mundwerkzeugen+der+insekten+++%28oliver+eikel%29/90917.html>
- [26] Sachse, S., & Krieger, J. (n.d.). Der Geruchssinn der Insekten-Primärprozesse der Duftstofferkennung und Kodierung.
- [27] Nervengewebe, Synapsen und Transmitter - Wissen @ AMBOSS. (n.d.). Retrieved August 17, 2023, from <https://www.amboss.com/de/wissen/nervengewebe-synapsen-und-transmitter>
- [28] Pellegrino M, Nakagawa T. Smelling the difference: controversial ideas in insect olfaction. *J Exp Biol*. 2009 Jul;212(Pt 13):1973-9. doi: 10.1242/jeb.023036. PMID: 19525421; PMCID: PMC2702451.
- [29] L. Buck, R. Axel: A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175-187 (1991)
- [30] Grosse-Wilde E, Kuebler LS, Bucks S, Vogel H, Wicher D, Hansson BS. Antennal transcriptome of *Manduca sexta*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 3;108(18):7449-54. doi: 10.1073/pnas.1017963108. Epub 2011 Apr 15. PMID: 21498690; PMCID: PMC3088587
- [31] Kingan, T. G., & Hildebrand, J. G. (1985). Screening and Assays for Neurotransmitters in the Insect Nervous System. 1–24. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-70045-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-70045-3_1)
- [32] Homberg, U. (2002). Neurotransmitters and neuropeptides in the brain of the locust. *Microscopy Research and Technique*, 56(3), 189–209. <https://doi.org/10.1002/jemt.10024>
- [33] Neurotransmitter und Neuromodulatoren - via medici: leichter lernen - mehr verstehen. (n.d.). Retrieved August 17, 2023, from <https://viamedici.thieme.de/lernmodul/543133/532533/neurotransmitter+und+neuromodulatoren>
- [34] Grahame-Smith DG. Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT). *Q J Med*. 1988 Jun;67(254):459-66. PMID: 3074334.

- [35] Dekan, Z., Kremsmayr, T., Keov, P., Godin, M., Teakle, N., Xiang, H., Gharib, D., Bergmayr, C., Hellinger, R., Gay, M., Vilaseca, M., Kurzbach, D., Albericio, F., Alewood, P. F., Gruber, C. W., & Muttenthaler, M. (2021). Nature-inspired dimerization as a strategy to modulate neuropeptide pharmacology exemplified with vasopressin and oxytocin †. <https://doi.org/10.1039/d0sc05501h>
- [36] Nässel, D. R. (1999). Histamine in the brain of insects: A review. In *Microscopy Research and Technique* (Vol. 44, Issues 2–3, pp. 121–136). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19990115/01\)44:2/3<121::AID-JEMT6>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19990115/01)44:2/3<121::AID-JEMT6>3.0.CO;2-F)
- [37] Der Flug der Insekten • Informationen für Medien und Journalist\*innen • Freie Universität Berlin. (n.d.). Retrieved August 16, 2023, from [https://www.fu-berlin.de/presse/publikationen/fundiert/archiv/2007\\_01/07\\_01\\_pflueger/index.html](https://www.fu-berlin.de/presse/publikationen/fundiert/archiv/2007_01/07_01_pflueger/index.html)
- [38] Xie, G. Y., Ma, B. W., Liu, X. L., Chang, Y. J., Chen, W. B., Li, G. P., Feng, H. Q., Zhang, Y. J., Berg, B. G., & Zhao, X. C. (2019). Brain organization of apolygus lucorum: A hemipteran species with prominent antennal lobes. *Frontiers in Neuroanatomy*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00070>
- [39] Malun, D. (1998). Early Development of Mushroom Bodies in the Brain of the Honeybee *Apis mellifera* as Revealed by BrdU Incorporation and Ablation Experiments.
- [40] Rolf G. Beutel, Frank Friedrich, Si-Qin Ge, & Xing-Ke Yang. (2014). *Insect Morphology and Phylogeny\_ A textbook for students of entomology*
- [41] Anton, S., & Rössler, W. (n.d.). Plasticity and modulation of olfactory circuits in insects. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03329-z/Published>
- [42] Field, L. M., Pickett, J. A., & Wadhams, L. J. (2000). Molecular studies in insect olfaction. *Insect Molecular Biology*, 9(6), 545–551. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2583.2000.00221.X>
- [43] Westbrook, T. F., Martin, E. S., Schlabach, M. R., Leng, Y., Liang, A. C., Feng, B., Zhao, J. J., Roberts, T. M., Mandel, G., & Hannon, G. J. (2005). Small CTD phosphatases function in silencing neuronal gene expression. *Current Biology*, 121, 668. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.08.032>
- [44] Hansson, B. S., & Anton, S. (2000). FUNCTION AND MORPHOLOGY OF THE ANTENNAL LOBE: New Developments. *Annu. Rev. Entomol*, 45, 203–231. [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
- [45] Therese Skiri, H., Rø, H., Berg, B. G., & Mustaparta, H. (2005). Consistent Organization of Glomeruli in the Antennal Lobes of Related Species of Heliothine Moths. *J. Comp. Neurol*, 491, 367–380. <https://doi.org/10.1002/cne.20692>
- [46] Couto, A., Alenius, M., & Dickson, B. J. (2005). Molecular, Anatomical, and Functional Organization of the *Drosophila* Olfactory System. *Current Biology*, 15, 1535–1547. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.034>
- [47] Galizia, C. G., Menzel, R., & Hölldobler, B. (1999). Optical Imaging of Odor-Evoked Glomerular Activity Patterns in the Antennal Lobes of the Ant *Camponotus rufipes*. In *Naturwissenschaften* (Vol. 86). Springer-Verlag
- [48] Schenk, J. E., & Gaudry, Q. (2023). Nonspiking Interneurons in the *Drosophila* Antennal Lobe Exhibit Spatially Restricted Activity. *ENeuro*, 10(1). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0109-22.2022>
- [49] Gaudry, Q. (2018). Serotonergic Modulation of Olfaction in Rodents and Insects. *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE*, 91, 23–32.
- [50] Heisenberg, M. (2003). Mushroom body memoir: From maps to models. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(4), 266–275. <https://doi.org/10.1038/nrn1074>
- [51] Heisenberg, M. (1998). What Do the Mushroom Bodies Do for the Insect Brain? An Introduction. *Learning & Memory*, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.1101/LM.5.1.1>
- [52] Brandt, R., Rohlfing, T., Rybak, J., Krofczik, S., Maye, A., Westerhoff, M., Hege, H. C., & Menzel, R. (2005). Three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. *Journal of Comparative Neurology*, 492(1), 1–19. <https://doi.org/10.1002/CNE.20644>

- [53] Strausfeld, N. J. (2002). Organization of the honey bee mushroom body: representation of the calyx within the vertical and gamma lobes. *The Journal of Comparative Neurology*, 450(1), 4–33. <https://doi.org/10.1002/CNE.10285>
- [54] Zars, T. (2000). Behavioral functions of the insect mushroom bodies. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(6), 790–795. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00147-1](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00147-1)
- [55] Strausfeld NJ, Sinakevitch I, Brown SM, Farris SM. Ground plan of the insect mushroom body: functional and evolutionary implications. *J Comp Neurol*. 2009 Mar 20;513(3):265-291. doi: 10.1002/cne.21948. PMID: 19152379; PMCID: PMC4876875
- [56] Luu, N. A., Belal Talukder, Dimitriou, E., Just, L., Asel, V., Hansson, B. S., & Rybak, J. (n.d.). Adaptation of olfactory brain regions in Hemiptera in transition from land to water habitats.
- [57] Caron S, Abbott LF. Neuroscience: Intelligence in the Honeybee Mushroom Body. *Curr Biol*. 2017 Mar 20;27(6):R220-R223. doi: 10.1016/j.cub.2017.02.011. PMID: 28324737; PMCID: PMC5800505.
- [58] Sommerlandt, F. M. J., Spaethe, J., Rössler, W., & Dyer, A. G. (2016). Does Fine Color Discrimination Learning in Free-Flying Honeybees Change Mushroom-Body Calyx Neuroarchitecture? <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164386>

## Selbstständigkeitserklärung

Ich, Victoria Asel versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die inhaltlich oder wörtlich aus Veröffentlichungen stammen, sind kenntlich gemacht. Diese Arbeit lag in der gleichen oder ähnlichen Weise noch keiner Prüfungsbehörde vor und wurde bisher noch nicht veröffentlicht. Hiermit erkläre ich mich mit der Einsichtnahme in meine Abschlussarbeit im Archiv der Bibliothek der EAH Jena einverstanden.

---

Ort, Datum

---

Victoria Asel